



*Università degli Studi di Palermo*



*Ministero dell'Istruzione  
dell'Università e Ricerca*

Dottorato di Ricerca in Oncobiologia Sperimentale

---

Il partenolide induce morte cellulare caspasi-  
indipendente in cellule di osteosarcoma umano MG63  
(SSD Bio/10)

Tutor:

Dott.ssa Antonella D'Anneo

Tesi di dottorato di:

Dott. Dario Di Gesù

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Renza Vento

# INDICE

## INTRODUZIONE

### IL PARTENOLIDE E I SESQUITERPENI LATTONI

Pag. 1

### PARENOLIDE ED NF-kB

Pag. 6

### IL PARTENOLIDE E LA VIA DI TRASDUZIONE JAK/STAT

Pag. 10

### PARTENOLIDE E STRESS OSSIDATIVO

Pag. 14

### PARTENOLIDE E JNK

Pag. 18

### SPECIFICITÀ DEGLI EFFETTI DEL PARTENOLIDE

Pag. 20

### RUOLO DEL MITOCONDRIO NEI MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

Pag. 22

FATTORI DI MORTE RILASCIATI DAL MITOCONDRIO	Pag. 28
MITOCONDRI E CELLULE TUMORALI	Pag. 32
L'OSTEOSARCOMA E LA LINEA MG63	Pag. 37
<b>MATERIALI E METODI</b>	
CONDIZIONI DI COLTURA DELLE CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG63	Pag. 41
OSSERVAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE, DELLO STATO DI CONDENSAZIONE DELLA CROMATINA E DELLA FRAMMENTAZIONE CELLULARE MEDIANTE MICROSCOPIA A FLUORESCENZA	Pag. 43
DISTRIBUZIONE CELLULARE LUNGO LE FASI DEL CICLO CELLULARE	Pag. 45
MISURA DEI ROS INTRACELLULARI	Pag. 46

## MISURA DEL CALCIO INTRACELLULARE

Pag. 47

## VALUTAZIONE DEI GRUPPI SULFIDRILICI TOTALI

Pag. 48

## VALUTAZIONE DEI GRUPPI SULFIDRILICI LIBERI

Pag. 49

## VALUTAZIONE DEL GLUTATIONE RIDOTTO INTRACELLULARE

Pag. 50

## VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE

Pag. 51

## VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE INTRACEL- LULARE DI AIF MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

Pag. 53

## RISULTATI

## IL TRATTAMENTO CON PARTENOLIDE È IN GRADO DI INDURRE MORTE CASPASI INDIPENDENTE IN CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG63

Pag. 55

**IL PARTENOLIDE PROVOCA UN RAPIDO INCREMENTO DEI  
ROS INTRACELLULARI**

Pag. 60

**IL PARTENOLIDE CAUSA UNA DIMINUZIONE DEI GRUPPI  
SULFIDRILICI CELLULARI**

Pag. 64

**IL TRATTAMENTO CON PARTENOLIDE PROVOCA UN  
RAPIDO INCREMENTO DEL CALCIO INTRACELLULARE**

Pag. 67

**IL TRATTAMENTO CON PARTENOLIDE PROVOCA  
DISSIPAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA  
MITOCONDRIALE ( $\Delta\psi_m$ )**

Pag. 69

**IL PARTENOLIDE INDUCE LA TRASLOCAZIONE DEL  
FATTORE DI MORTE AIF DALLA SEDE MITOCONDRIALE AL  
NUCLEO**

Pag. 72

**DISCUSSIONE**

Pag. 74

**BIBLIOGRAFIA**

Pag. 80



# INTRODUZIONE

## IL PARTENOLIDE E I SESQUITERPENI LATTONI

Il partenolide (PN) è una molecola appartenente all'ampia famiglia di composti naturali (o derivati) chiamati sesquiterpeni lattoni (SL) [1].

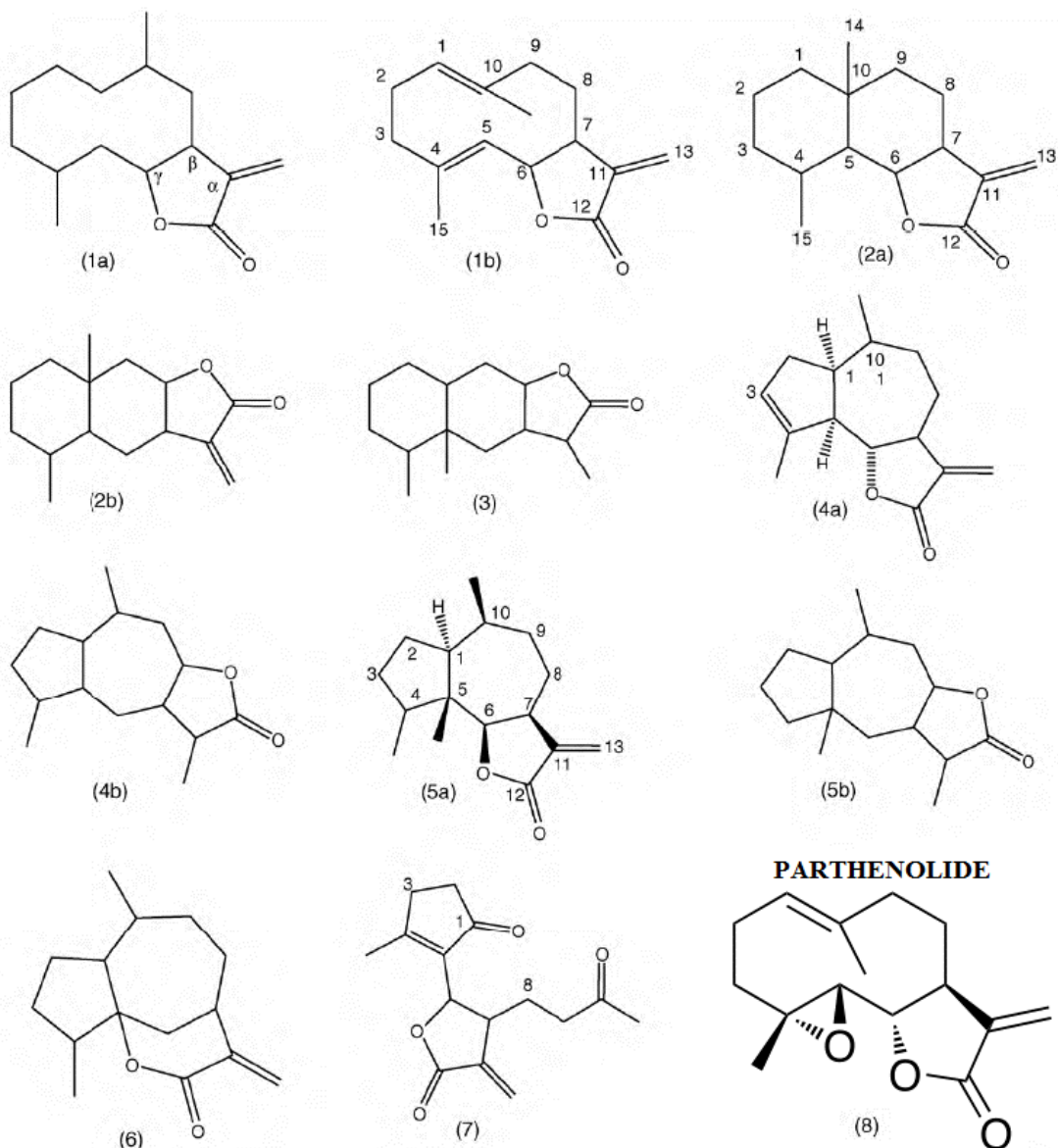
La ricerca scientifica sui SL ebbe inizio pochi anni dopo il 1960, in seguito a un programma di screening su larga scala svolto dal National Cancer Institute (USA), nel quale furono analizzati più di 350000 campioni vegetali allo scopo di identificare potenziali agenti antitumorali [2].

I SL sono una sottofamiglia dei terpenoidi, composti stabili, incolori, di sapore amaro e con caratteristiche lipofile. Sono estratti quasi esclusivamente dalle *Asteraceae*, ma spesso possono anche costituire più dell'1% del peso secco di *Umbelliferae* e *Magnoliaceae*. L'isolamento avviene solitamente a partire dalle foglie o dai fiori delle piante, di cui arrivano a costituire fino al 5% del peso secco. Sono composti a quindici atomi di Carbonio costituiti da 3 unità isopreniche e un gruppo lattonico (un estere ciclico). La loro catalogazione è basata sullo scheletro carbociclico e dà luogo ai seguenti gruppi principali: germacranolidi (anello a dieci atomi, classe cui appartiene anche il PN), eudesmanolidi ed eremofilanolidi

(composti 6/6-biciclici), guaianolidi, pseudoguaianolidi e ipocretenolidi (composti 5/7-biciclici). Guaianolidi e pseudoguaianolidi presentano scheletri quasi identici, ma differiscono per la posizione di un gruppo metilico, presente al C-4 nei guaianolidi e al C-5 negli pseudoguaianolidi. Alcuni membri di questi gruppi presentano anche strutture con anelli aperti come gli iso-seco-tanopartolidi. I germacranolidi rappresentano filogeneticamente, i composti più primitivi a partire dai quali si sono evoluti i successivi. Tutti i SL contengono un anello  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattonico fuso in *cis*- o in *trans*- alla posizione C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> o C<sub>8</sub>-C<sub>7</sub> dello scheletro carbossilico. Il termine *cis*- o *trans*- si riferisce all'orientamento degli anelli a cinque o sette atomi situati ai lati opposti del legame tra C<sub>1</sub> e C<sub>5</sub> **Fig. 1** [1].

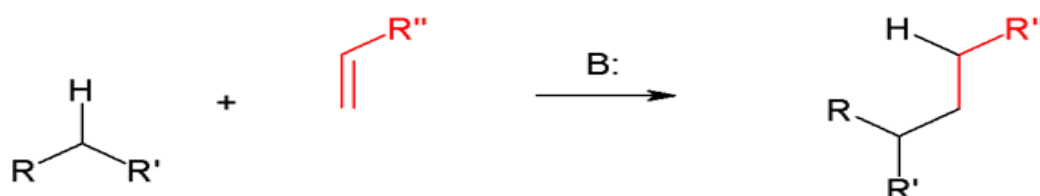
In particolare, il PN è il principale componente della famiglia isolato da diverse erbe medicinali di origine messicana come la *Tanacetum parthenium*, nota anche col nome comune di “feverfew”. La somministrazione orale, o per infusione, di tali piante è stata adoperata per secoli da popoli indigeni dell’America Centrale per la cura di emicranie, infiammazioni, gastriti, mal di denti, irregolarità mestruali, febbre e artrite reumatoide. Recenti studi hanno messo in evidenza come il composto possieda anche proprietà antimicrobiche, antivirali e antitumorali [3].





**Fig. 1: Struttura chimica delle diverse classi di Sesquiterpeni Lattoni e del Partenolide.** (1a-1b): Isomeri Germacranolidi. (2a-2b): Isomeri Eudesmanolidi. (3): Eremofilanolide. (4a-4b): Isomeri Guaianolidi. (5a-5b): Isomeri Pseudoguaianolidi. (6): Ipocretenolide. (7): Iso-seco-tanapartolide. (8): Partenolide.

Si ritiene che la bioattività dei SL sia mediata dall'alchilazione di nucleofili, tramite le loro strutture carboniliche  $\alpha,\beta$ - o  $\alpha,\beta,\gamma$ - insature, come gli  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattoni o i ciclopentenoni  $\alpha,\beta$ -insaturi. Questi elementi strutturali reagiscono coi gruppi nucleofili, in particolare coi gruppi sulfidrilici, mediante addizione di Michael, reazione che consiste nell'addizione nucleofila di anioni enolato di un derivato metilenico (di un chetone o di un'aldeide) a composti carbonilici alfa-beta insaturi, e precisamente al carbonio  $\beta$ , definiti accettori di Michael (Fig. 2). È pertanto largamente accettata l'ipotesi secondo la quale gruppi tiolici, quali i residui aminoacidici di cisteina presenti nelle proteine e il glutatione (GSH) intracellulare libero, fungono da bersagli principali dei SL. Le interazioni tra i SL e i gruppi tiolici o il GSH libero portano alla riduzione di attività enzimatiche e interferiscono col metabolismo del GSH e l'equilibrio redox, essenziale per la sopravvivenza della cellula [4].



**Fig 2: Michael Reaction.** In questo schema, i sostituenti R e R' sul nucleofilo (o donatore di Michael), sono gruppi elettrone-attrattori come gruppi acilici o cianilici, che rendono l'idrogeno metilenico acido e dando luogo a un carbanione in seguito alla reazione con la base B:. Il sostituente R'' sull'alchene attivato, anche chiamato accettore di Michael, è solitamente un chetone, ma può anche essere un gruppo nitrico.

La relazione tra struttura chimica e bioattività dei SL è stata studiata in diversi sistemi modello, specialmente in merito alla loro citotossicità e alle proprietà antiinfiammatorie e antitumorali. Si ritiene sin dai primi studi che il gruppo esometilenico sul lattone sia per l'appunto essenziale per la citotossicità e l'attività antitumorale dei SL [5]. Tuttavia, in passato è stato messo in luce come il fattore cui è dovuta la citotossicità dei SL potrebbe essere il gruppo  $O=C-C=CH_2$ , indipendentemente dalla presenza del gruppo lattonico o del ciclopentenone [6]. Successivamente è stato dimostrato che la presenza di ulteriori gruppi alchilanti è in grado d'incrementare notevolmente la citotossicità dei SL [7] ed è stato stabilito che il gruppo  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattone e l'anello ciclopentenonico  $\alpha,\beta$ -insaturo (o uno  $\alpha$ -epossiciclopentenonico) presenti nei SL sono essenziali per la loro attività antitumorale *in vivo* [8]. Alcune osservazioni suggeriscono una relazione positiva tra la lipofilicità e la citotossicità dei SL, così come una relazione inversa esistente tra l'ingombro sterico dei gruppi tiolici e la stessa. Inoltre, è stata studiata mediante spettroscopia H NMR la reattività dei due potenziali siti bersaglio per addizione di Michael da parte dei SL elenanolidi ai gruppi tiolici fisiologici di Glutathione e Cisteina in soluzione acquosa. È stato così stabilito che l'intorno chimico del sulfidril bersaglio riveste un ruolo importante per la bioattività di questi composti [9].

In un altro studio è stata valutata la relazione tra la struttura di ventotto SL (rappresentativi della quasi totalità delle strutture scheletriche, inclusi germacranolidi, eudesmanolidi, guaianolidi e pseudoguaianolidi) e la capacità d'inibire l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kappaB (NF-kB) da parte del fattore di necrosi tumorale (TNF). È stato osservato che la maggior parte dei SL che hanno un'attività inibente nei confronti di NF-kB presentano un gruppo  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattone altamente reattivo e che in alcuni casi la bioattività è ulteriormente incrementata da gruppi carbonilici insaturi  $\alpha,\beta$ - o  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -. Tale studio è stato confermato da una successiva analisi effettuata su 103 SL [10].

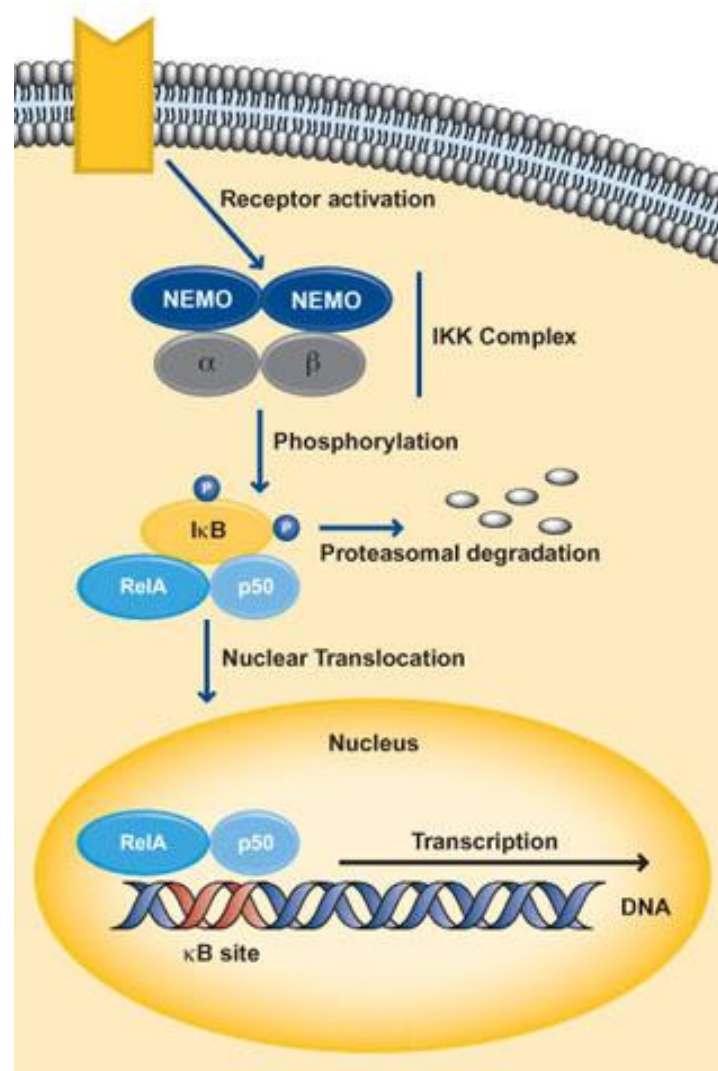
## **PARENOLIDE ED NF-kB**

NF-kB è un fattore di trascrizione ubiquitariamente espresso, che regola svariate funzioni vitali per la cellula, quali il ciclo cellulare, la differenziazione e la proliferazione, nonché svolge un ruolo molto importante nel controllo della risposta immunitaria e dell'infiammazione [11]. NF-kB è attivato in seguito a molti diversi stimoli proapoptotici, quali TNF- $\alpha$ , farmaci citotossici, radiazioni ionizzanti e stress ossidativo [12]. In risposta a tali segnali, NF-kB trasloca al nucleo e regola l'espressione dei geni antiapoptotici. Tali geni bersaglio includono quelli che esprimono il fattore 1 associato al

recettore per TNF- $\alpha$  (TRAF1), TRAF2, le cIAP, la manganese-superoossido dismutasi (MnSOD), A20 e IEX-1L [13]. Inoltre, NF- $\kappa$ B controlla l'espressione di Bfl1/A1e Bcl-xL, due proteine antiapoptotiche della famiglia di Bcl2 [14]. Perché NF- $\kappa$ B sia in grado di penetrare nel nucleo e dare luogo all'attivazione genica è necessario che sia rilasciato da I $\kappa$ B $\alpha$ , proteina che in sede citosolica forma un complesso con le due subunità di NF- $\kappa$ B (p50 e RelA). Perché ciò avvenga è necessaria la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  ad opera del complesso IKK $\gamma$ . La fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  porta alla sua ubiquitinazione ad opera di  $\beta$ TrCP e conseguente proteolisi (Fig. 3) [15]. Molteplici dati raccolti finora hanno messo in evidenza come alterazioni dei pathway di NF- $\kappa$ B possano avere un ruolo sia nella crescita tumorale, che nei processi d'invasione e metastasi [16]. Più recentemente, l'espressione costitutiva di NF- $\kappa$ B è stata evidenziata in diverse forme di malattie tumorali, quali la sindrome di Hodgkin [17], tumore del colon-retto [18], carcinoma mammario [19] e altri. Pertanto, l'inibizione di NF- $\kappa$ B è diventata una strategia di primario interesse nella ricerca contro il cancro.

L'inibitore di NF- $\kappa$ B maggiormente documentato è il PN. Secondo numerosi dati, il PN è un inibitore del complesso chinasi di I $\kappa$ B (IKC) e provoca una ritenzione di NF- $\kappa$ B nel citoplasma. IKC è costituito da due subunità IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  [20]. IKK $\beta$  è una subunità

del complesso modulatore essenziale di NF-kB/IKK $\gamma$ , associato ad Nf-kB e alla chinasi che attiva NF-kB (NIK). Inoltre, è ormai noto da tempo che tanto la MAP3 chinasi NIK che MEKK1 sono degli attivatori diretti di IKK [21]. È stato dimostrato che l'attività anti-infiammatoria del PN è dovuta al suo gruppo  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattone, che porta a un'inibizione di IKK $\beta$ , con conseguente stabilizzazione di Ikb $\alpha$  citosolica e inibizione della traslocazione di NF-kB [22]. In altri lavori, si specula che il PN interferisca col componente IKC necessario per la trasmissione del segnale responsabile dell'attivazione di entrambe le IKK. Poiché IKC non è funzionale in assenza del complesso modulatore essenziale di NF-kB/IKK $\gamma$ , quest'ultima proteina è considerata un potenziale candidato per l'attività inibitoria del PN [21]. In ogni caso, la somministrazione di PN blocca il legame al DNA da parte di NF-kB, rendendo le cellule tumorali più soggette ad apoptosi e sensibili a morte cellulare indotta da citochine e farmaci antitumorali [23].

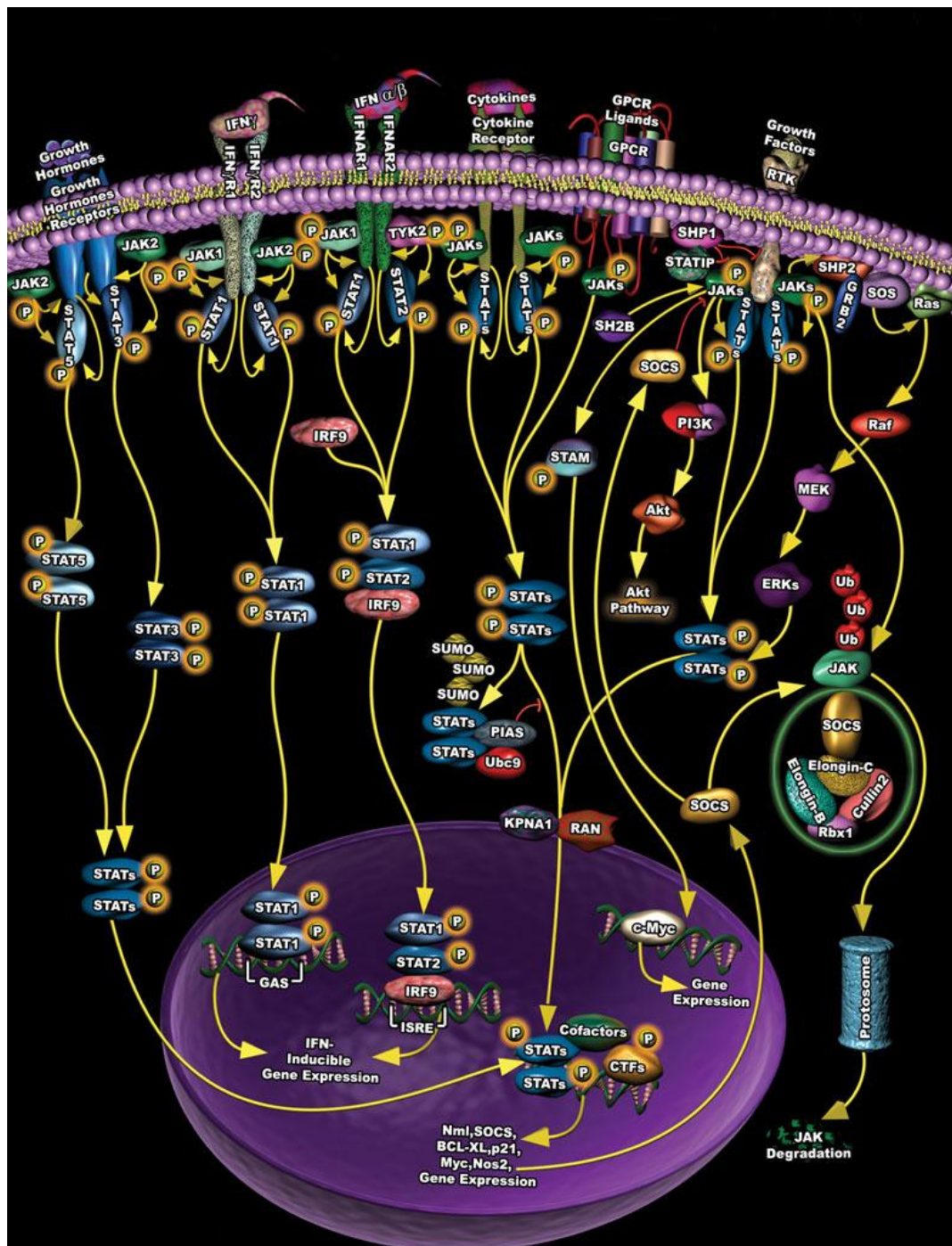


**Fig. 3: Schema del pathway mediato da NF-kB.**

## **IL PARTENOLIDE E LA VIA DI TRASDUZIONE JAK/STAT**

Le proteine traduttrici del segnale e attivatrici della trascrizione (STAT) rappresentano dei fattori di trascrizione extracellulari attivati da ligandi che regolano un ampio spettro di attività biologiche come la proliferazione, la trasformazione, l'apoptosi, il differenziamento, lo sviluppo fetale, l'infiammazione e la risposta immunitaria [24]. Ad oggi sono state identificate sette proteine STAT nei mammiferi: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b e STAT-6. La stimolazione da parte di citochine e fattori di crescita porta alla fosforilazione della tirosina presente sulle STAT, seguita dalla dimerizzazione e dalla successiva regolazione genetica esercitata mediante legame diretto del DNA consenso. Molte tirosin-chinasi, incluse le JAK (Janus chinasi), TYK (tirosina chinasi), RTK (tirosina chinasi recettoriale), e altre tirosin-chinasi non recettoriali possono fosforilare le STAT. In cellule normali la fosforilazione delle STAT è un evento transiente, dalla durata compresa tra i 30 minuti e alcune ore (Fig. 4).





**Fig. 4:** Schema della via di segnalazione di JAK/STAT.

Tuttavia in numerose linee cellulari tumorali o in tumori primari le STAT, specialmente la STAT-3, sono permanentemente fosforilate, o a causa di un'errata regolazione degli attivatori delle STAT, quali le tirosin chinasi a monte (JAK, TYK), o mediante la repressione dei

regolatori negativi della fosforilazione, come le fosfatasi, i soppressori della segnalazione delle citochine (SOCS) o gli inibitori proteici delle STAT attive (PIAS) [25].

STAT costitutivamente attive sono state rilevate in casi di leucemia, mieloma multiplo, carcinoma mammario, tumore alla prostata, carcinoma del colon retto, tumore epatico, tumore della pelle ed altri [26]. I prodotti della trascrizione genetica regolata da STAT, tra cui Bcl-xL e survivina, permettono alle cellule tumorali di proliferare e inibiscono l'apoptosi. Pertanto sono stati oggetto d'intensi studi tutti i composti in grado d'inibire l'attività delle STAT in cellule tumorali, tra cui il PN risulta ad oggi essere il miglior candidato per la terapia antitumorale.

Esistono dati che suggeriscono come nella linea cellulare di epatocarcinoma umano HepG2 l'attivazione di STAT-3 sia dovuta all'azione di citochine appartenenti alla famiglia delle IL-6. La via di segnalazione innescata da tali citochine, in cellule HepG2, porta all'attivazione delle proteine tipiche della fase acuta di derivazione epatica (APP) come ACT ( $\alpha_1$ -antichimotripsina) [27]. La presenza del partenolide inibisce efficientemente la sovraespressione del mRNA di ACT indotta dalle citochine di tipo IL-6. Ulteriori analisi hanno rivelato che l'effetto esercitato dal partenolide dipende dall'inibizione di STAT-3 e dal legame di STAT-1 agli elementi di regolazione

presenti sul DNA. Inoltre, il PN inibisce il legame di STAT-3, mediante inibizione della fosforilazione del residuo di tirosina 705 indotta da OSM. Ciò previene la dimerizzazione di STAT-3, fondamentale per la sua traslocazione al nucleo e l'attivazione genica. Alcuni autori hanno supposto che il PN inibisca le JAK mediante legame coi loro gruppi sulfidrilici, come supportato dalla capacità dell'agente riducente  $\beta$ -mercaptoetanololo di ripristinare la risposta ai segnali mediati dalle citochine, probabilmente impedendo al PN di interagire coi gruppi sulfidrilici delle proteine [28]. Un'altra citochina che può mediare il proprio segnale attraverso le STAT è IL-4. Tale citochina stimola la trascrizione genica mediata da STAT-6 in cellule endoteliali. La somministrazione di partenolide è in grado d'inibire il legame al DNA da parte di STAT-6, sebbene esso non interferisca con la fosforilazione del residuo di tirosina 641 di STAT-6 ad opera di IL-4, né con la fosforilazione dell'adattatore molecolare JAK2 (anch'essa necessaria per la dimerizzazione e la traslocazione di STAT-6 al nucleo). È possibile che i bersagli del PN nella via di segnalazione di JAK/STAT siano specifici del tipo cellulare. Infine, è stata confermata un'attività inibente da parte del PN nei confronti di STAT-1 e STAT-3 in condrociti articolari [29].

## **PARTENOLIDE E STRESS OSSIDATIVO**

Il termine “stress ossidativo” si riferisce alle condizioni della cellula in presenza di una produzione eccessiva di specie reattive dell’ossigeno (ROS) e/o malfunzionamento dei sistemi di difesa contro l’ossidazione. Lo stato redox intracellulare è determinato dall’equilibrio tra la produzione di specie reattive dell’ossigeno e il sistema di tamponamento endogeno basato sui gruppi tiolici, che include un elevato numero di molecole non proteiche a basso peso molecolare, come il Glutatione (GSH), così come molteplici gruppi tiolici proteici, quale la tioredossina. È già stato abbondantemente mostrato come lo stato redox intracellulare abbia un ruolo fondamentale per la sopravvivenza o la morte cellulare [30]. Molti farmaci antitumorali sono induttori dell’apoptosi poiché alterano l’equilibrio redox, facendo diminuire i gruppi tiolici intracellulari mediante estrusione o redistribuzione del GSH. Lo squilibrio nello stato redox intracellulare innesca dunque una serie di eventi cellulari che portano alla morte cellulare per apoptosi, come l’alterazione della funzione mitocondriale e le vie del segnale intracellulari [31].

Secondo alcuni studi il partenolide modula l’omeostasi redox consentendo la progressione verso la morte cellulare. In cellule di cancro al colon retto, il PN consuma il GSH intracellulare e i gruppi

tiolici proteici in funzione della dose e del tempo di somministrazione. Inoltre, il PN incrementa significativamente i livelli dei ROS intracellulari e del Calcio citosolico, con conseguente stress del Reticolo Endoplasmatico (ER). Un pretrattamento delle stesse cellule tumorali con N-acetil-L-cisteina (NAC), diminuisce i livelli intracellulari di ROS e protegge le cellule dall'apoptosi indotta dal PN, mentre al contrario un pretrattamento con un inibitore della sintesi del GSH, la butionina sulfoximina (BSO), provoca un'ulteriore consumo del GSH e sensibilizza le cellule al trattamento con PN, sebbene il trattamento con BSO non sia in grado, quando impiegato singolarmente, di indurre apoptosi, suggerendo pertanto che il GSH rivesta un ruolo importante per l'apoptosi indotta da PN [32]. Recenti studi hanno anche messo in luce come il PN attivi la NADPH-ossidasi selettivamente in cellule tumorali, con conseguente diminuzione dei livelli di tioredossina ridotta, attivazione di fosfoinositolo-3 chinasi/Akt e quindi fosforilazione di FOXO3a, che ha come risultato finale la regolazione negativa degli enzimi antiossidanti bersagli di FOXO3a: manganese superossido dismutasi e catalasi [33].

Considerando che la catena respiratoria dei mitocondri è la principale fonte di ROS intracellulari, la loro integrità e funzione sono essenziali e spesso affetti dallo stress ossidativo, pertanto sono stati osservati alcuni effetti del PN sulle funzioni mitocondriali. Si è osservato che il

PN attiva le caspasi, causa dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e favorisce il rilascio di proteine mitocondriali proapoptotiche come il citocromo *c* e Smac/DIABLO. A conferma dell'induzione della via di segnalazione intrinseca (mitocondriale), dopo la somministrazione con PN si osserva sulla membrana mitocondriale il processamento di Bid a tBid ad opera della caspasi-8. tBid ha un'attività proapoptotica strettamente correlata a quella delle altre proteine della famiglia Bcl-2. Esistono due possibili meccanismi con cui tBid può indurre disfunzioni mitocondriali: traslocazione e oligomerizzazione di tBid sulla membrana mitocondriale con conseguente rilascio di citocromo *c*, o attivazione di altre proteine come Bak o Bax [34]. In cellule di tumore al colon retto sono stati osservati i cambi conformazionali di Bax e una regolazione positiva di Bak in seguito a trattamento con PN. L'insieme dei cambiamenti subiti dai fattori proapoptotici della famiglia Bcl-2 portano a disfunzioni mitocondriali e all'induzione di apoptosi [35].

L'induzione di apoptosi da parte del PN è stata osservata anche in cellule di mieloma multiplo (cellule MM). Un'analisi accurata ha rivelato che la suscettibilità di queste cellule al PN è dovuta soprattutto alla mancata attività catalasica. L'enzima catalasi, è infatti quasi assente in cellule MM, mentre la sua normale espressione sembra rendere le cellule normali immuni agli effetti tossici del PN.

In contrasto con gli studi precedenti, in cellule MM non si è evidenziata in seguito al trattamento con PN alcuna alterazione dell'attività di Bcl-xL o di JNK, suggerendo pertanto che questo composto possa svolgere la propria azione antitumorale secondo meccanismi diversi in linee cellulari differenti [36]. Un'ulteriore evidenza sperimentale che ha supportato il coinvolgimento dello stress ossidativo nei meccanismi di morte mediati dal PN è stata fornita da studi in cellule di leucemia linfoblastica acuta pre-B (cellule ALL appartenenti alle linee SEM e RS4;11). Nelle cellule ALL il trattamento con PN induce una rapida morte per apoptosi caratterizzata da perdita di DNA nucleare, esposizione sulla membrana cellulare esterna di fosfatidilserina e depolarizzazione della membrana mitocondriale. Utilizzando colorazioni specifiche per le specie reattive dell'ossigeno, è stato messo in evidenza l'incremento di ossido nitrico e dell'anione superossido dopo appena 4h di esposizione al composto [37].

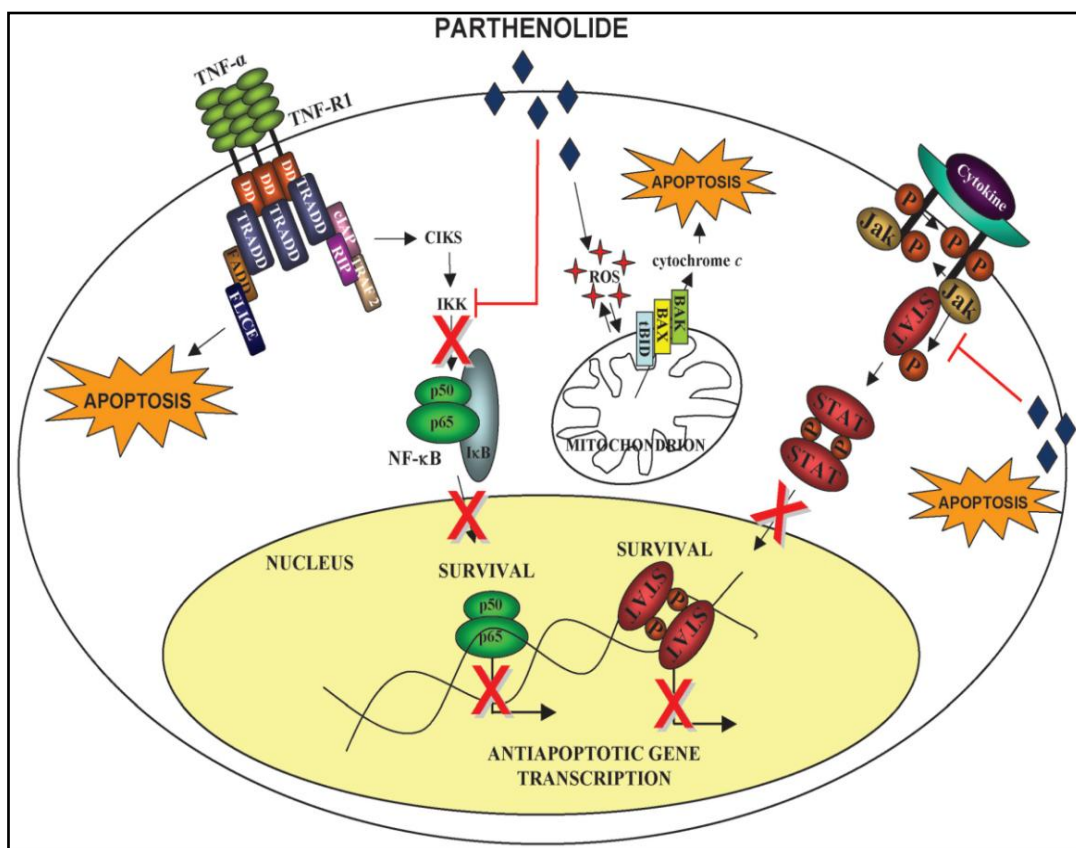
È quindi evidente che il PN è in grado di agire su diverse vie di segnalazione intracellulari e che la modulazione dello stress ossidativo sembra essere una delle sue modalità d'azione antitumorale.

## **PARTENOLIDE E JNK**

JNK, insieme alle ERK, p38 e ERK5, appartiene al gruppo delle proteina chinasi attivate da mitogeni (MAPK). Tutte le MAPK sono attivate mediante duplice fosforilazione in un motivo ricco in treonine e tirosine all'interno del loop d'attivazione. Una volta attivate, esse traslocano al nucleo e fosforilano fattori di trascrizione bersaglio come c-Jun. Uno dei maggiori attivatori della via di trasduzione di JNK è rappresentato dalle radiazioni UV, sebbene il ruolo di JNK nell'induzione dell'apoptosi in risposta a questo tipo di stress sia ancora controverso. Infatti, sebbene sia stato dimostrato come JNK fosse essenziale per l'induzione dell'apoptosi da parte di UV in fibroblasti embrionali murini, è stato altresì messo in evidenza un ruolo per JNK come inibitore dell'apoptosi indotta da UV [38]. In alcuni studi è stato osservato che il partenolide può inibire l'attivazione di JNK sensibilizzando cellule epidermiche murine JB6 all'apoptosi indotta da UV (suggerendo un ruolo antiapoptotico per JNK, almeno nel sistema adoperato). Inoltre, il PN sembra in grado di inibire l'attivazione di p38, sensibilizzando in questo caso a morte cellulare indotta da UV. La sensibilità a fenomeni di morte cellulare indotta da UV in cellule JB6 trattate con PN è risultata doppia rispetto a quella di cellule trattate coi singoli inibitori di JNK o p38 [39]. Altri



studi hanno ottenuto risultati opposti per quanto concerne l'influenza del PN sull'attività di JNK. È stata infatti esaminata l'attivazione TNF- $\alpha$ -dipendente di JNK nella linea cellulare di carcinoma nasofaringeo umano CNE1. L'effetto del PN è stato di sensibilizzare le cellule CNE1 all'apoptosi mediata da TNF- $\alpha$ . L'effetto è conseguenza dell'inibizione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta da TNF- $\alpha$ , tuttavia è stato anche proposto un meccanismo alternativo, basato sul mancato assemblaggio di IKK con TNF-R1. Tuttavia, l'osservazione che il partenolide è in grado d'indurre e prolungare l'attivazione di JNK anche quando adoperato senza l'aggiunta di altri composti, suggerisce che il PN possa esercitare il proprio ruolo anche grazie a una via di trasduzione indipendente da TNF- $\alpha$  (Fig. 5) [40].



**Fig. 5: Schema riassuntivo dei diversi meccanismi di morte indotti dal PN.**

## **SPECIFICITÀ DEGLI EFFETTI DEL PARTENOLIDE**

Studi d'immunoterapia intensiva hanno rivelato l'esistenza di molti inibitori metabolici, tra cui cicloesamide, actinomicina D, asinomicina, harringtonina e altre molecole in grado di modulare la resistenza di diversi tumori alla morte cellulare indotta da citochine [41]. Tuttavia, l'uso clinico di molti agenti che inducono morte

cellulare nei tumori è limitato a causa della loro mancanza di specificità d'azione e citotossicità. Di contro, in virtù della propria limitata citotossicità il partenolide sembra essere un agente ideale per l'immunoterapia antitumorale del prossimo futuro. Gli effetti su JNK mediati dal PN possono essere sia antiapoptotici che proapoptotici. Va infatti notato come l'effetto del PN su cellule normali ne aumenti la vitalità, rendendole resistenti a UVB e all'apoptosi indotta dai ROS [42]. Al contrario il PN è tossico per le cellule tumorali. Un buon esempio della specificità del PN è stato mostrato in un lavoro in cui è stato confrontato l'effetto del composto su cellule leucemiche e cellule normali della linea ematopoietica. La vitalità di cellule di leucemia mieloide acuta e leucemia mieloide cronica è stata fortemente ridotta a circa un decimo di quella delle cellule ematopoietiche di controllo, dopo la somministrazione del PN. Un'analisi analoga su cellule progenitrici e staminali delle linee mieloidi e linfoidi ha confermato l'assenza di tossicità da parte del PN su cellule normali e una specifica azione antitumorale su cellule cancerose [43].

## **RUOLO DEL MITOCONDRIO NEI MECCANISMI DI MORTE CELLULARE**

È stato ormai stabilito con certezza che i mitocondri hanno un ruolo centrale in tutte le più diffuse vie di segnalazione di morte cellulare. I due programmi di morte cellulare maggiormente caratterizzati ad oggi sono l'autofagia, la necroptosi e l'apoptosi, quest'ultima caratterizzata da due vie di segnalazione maggiori e intersecanti, l'una mediata da recettori di morte (via estrinseca) e l'altra dal mitocondrio (via intrinseca). È interessante notare come l'autofagia tenda ad attivarsi quando l'apoptosi è inibita e viceversa. Il principale punto di contatto tra i due meccanismi di morte sembra essere rappresentato dal mitocondrio e più in particolare dalla sua membrana, infatti la vitalità cellulare dipende fortemente dalle funzioni critiche delle membrane mitocondriali [44]. La Membrana Mitocondriale Interna (MIM) è la sede delle più importanti reazioni redox che convertono l'energia contenuta nei nutrienti in energia chimica. Tali reazioni richiedono il trasferimento degli elettroni da NADH e FADH<sub>2</sub>, lungo i complessi della catena respiratoria, fino all'Ossigeno molecolare, forte gruppo elettron attrahente. In accordo con la teoria chemiosmotica, la respirazione mitocondriale genera un potenziale transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ) attraverso la membrana interna che è adoperato dall'ATP-sintasi per fosforilare l'ADP ad ATP. La MIM è normalmente

impermeabile a protoni e altri ioni e questa sua caratteristica è indispensabile per il trasferimento dell'energia. La permeabilizzazione della MIM, infatti, dissipa il  $\Delta\psi$  e pertanto dissocia il processo di respirazione mitocondriale dalla funzione dell'ATP-sintasi, inibendo di fatto la produzione di ATP [45]. Al contrario della MIM, la Membrana Esterna Mitocondriale (MOM) è costitutivamente permeabile a piccole molecole, per via di canali non selettivi formati da una famiglia di porine mitocondriali, anche note come proteine canale per anioni voltaggio-dipendenti (VDAC). Tuttavia, la MOM è impermeabile alle proteine, elemento imprescindibile per la vita cellulare. La permeabilizzazione della MOM (MOMP) è un evento decisivo in molte forme di morte cellulare per apoptosi. La MOMP, infatti, permette al citocromo *c*, ad AIF e a molte altre proteine proapoptotiche di fuoriuscire nel citoplasma, dove possono promuovere l'attivazione delle caspasi e una rapida morte cellulare. Durante i più comuni processi apoptotici, la MOMP conduce a un rapido declino della respirazione mitocondriale. Sorprendentemente, il fenomeno non è dovuto a una dispersione del citocromo *c* nel citoplasma, quanto all'attivazione delle caspasi a valle della MOMP [46]. Tuttavia, questo calo respiratorio non indica che la bioenergetica sia irrilevante per il fato cellulare, infatti sebbene le cellule abbiano bisogno di ATP per

sopravvivere, esse hanno altresì bisogno di ATP per morire mediante apoptosi. L'esecuzione del programma apoptotico include reazioni che richiedono energia, incluse la segnalazione chinasi a monte della MOMP, la formazione dell'apoptosoma e l'attivazione delle caspasi a valle della MOMP. Quando i livelli cellulari di ATP calano eccessivamente, i classici interruttori dell'apoptosi scatenano una morte per necrosi, suggerendo che una continuata produzione di ATP (attraverso la fosforilazione ossidativa o quella glicolitica) è richiesta affinché le cellule possano intraprendere una morte secondo il programma apoptotico [47].

Sono stati suggeriti due meccanismi fondamentalmente diversi, ma non mutualmente esclusivi che sottostanno alla MOMP. Un meccanismo è noto come Transizione della Permeabilità della Membrana (MPT), che è il risultato dell'apertura di un poro non selettivo nella MIM dal diametro stimato di 2.3 nm. La MPT è tipicamente accompagnata da un rigonfiamento colloidale osmotico della matrice mitocondriale che porta ad una cattura meccanica della MOM. Il secondo meccanismo prevede la formazione di larghi pori nella MOM (ma non nella MIM) ed è direttamente promosso da due membri della famiglia delle proteine proapoptotiche Bcl-2, Bak e Bax. Va notato come questa famiglia comprenda sia fattori proapoptotici (Bad, Bax, Bok, Bid, Bim e altre), sia fattori

antiapoptotici (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-XL). I membri della famiglia Bcl-2 sono caratterizzati dalla presenza di domini BH (Bcl-2 Homology). Tra i membri della famiglia proapoptotica sono diffusi quattro domini BH (BH1, BH2, BH3 e BH4), sebbene alcuni membri (Bax, Bak) siano privi del dominio BH4, mentre altri (Bim, Bid, Bad) presentino solo il dominio BH3. Perché avvenga la formazione del poro da parte di Bak e Bax è necessario l'intervento della forma tronca di Bid (tBid), il cui taglio proteolitico avviene ad opera della Caspasi 8 [48]. Sebbene la MPT sia stata il primo meccanismo suggerito per la MOMP, essa non è attualmente considerata la via apoptotica canonica. Al contrario, la formazione di pori nella MOM mediata da Bax/Bak è attualmente considerata avere un ruolo primario nell'apoptosi sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Ciò non di meno, la morte cellulare mediata da MTP è presente in molti modelli in cui è presente una sovraespressione patofisiologica di  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriale e stress ossidativo, condizioni rilevanti (ad esempio) nel danno cellulare da riperfusione ischemica acuta, in molte forme di neurodegenerazione e in stress tossici [49]. Sono noti numerosi composti che facilitano o inibiscono l' MTP, tuttavia non è ad oggi nota l'esatta composizione molecolare del poro che consente l'MPT. È noto che il canale del poro è costituito dal legame del Traslocatore Nucleotidico dell'Adenina (ANT) con la ciclofilina D (CypD). È stato

suggerito che altri componenti del poro potrebbero essere rappresentati da VDAC, l'esochinasi II e la creatina chinasi [50], tuttavia recenti esperimenti genetici di knockout hanno messo in discussione il ruolo centrale di VDAC e ANT nella formazione del poro [51].

Non ci sono indicazioni che suggeriscano che le proteine della famiglia Bcl-2 possano avere un ruolo nella MPT. Al contrario vi sono evidenze significative, ottenute in sistemi a diversi livelli di complessità (topi alterati geneticamente, cellule intatte, cellule permeabilizzate mediante digitonina, mitocondri isolati e vescicole di membrana esterna isolate), che indicano fortemente che né la MPT, né la stessa MIM *per se*, siano coinvolte nell'induzione di MOMP da parte di Bax e Bak [52].

Gli studi più recenti, svolti sui topi, hanno confermato il ruolo dell'MPT in fenomeni di necrosi, ma non in fenomeni di apoptosi canonica. Inoltre, tali studi hanno messo in luce come mitocondri privi di CypD siano incapaci d'intraprendere la MPT, suggerendo un ruolo fondamentale della CypD in quest'evento. Infatti, cellule mutate in CypD risultano resistenti alla necrosi causata nelle cellule controllo mediante induzione dell'MPT, ma hanno mostrato le caratteristiche tipiche dell'apoptosi (attivazione delle caspasi, colorazione per l'Annessina V) in risposta a staurosporina, etoposide e altri noti

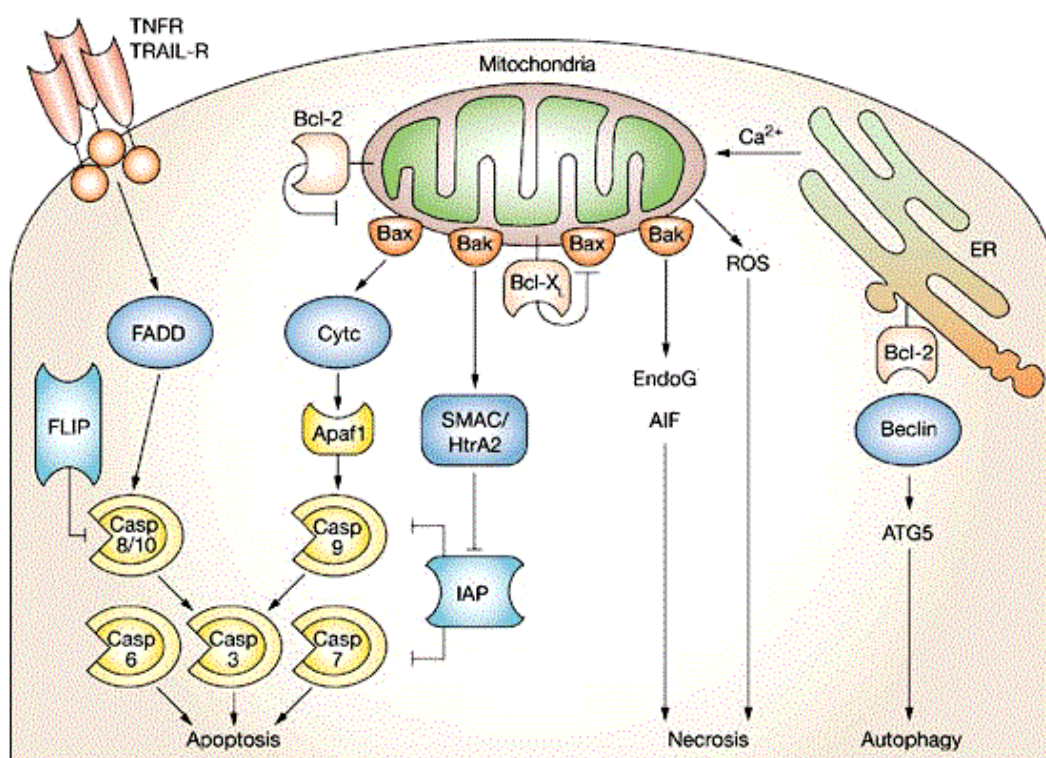


induttori di apoptosi. Esperimenti di morte cellulare per apoptosi *in vivo* hanno mostrato un'analoga indipendenza da CypD [53].

Al contrario, cellule mancanti di Bax/Bak, proteine effettrici della MOMP, sono resistenti all'effetto di molteplici induttori di apoptosi, ma vanno incontro a morte per necrosi in presenza di taspigarnina, un inibitore delle pompe per il  $\text{Ca}^{2+}$  del ER. Questo tipo di morte è caratterizzata da un sovraccarico mitocondriale di  $\text{Ca}^{2+}$ , rigonfiamento e rilascio del citocromo *c*, ma senza una rilevante attivazione delle caspasi [54].

Sebbene l'MPT non sia coinvolta nell'apoptosi, essa può interferire con le vie segnaletiche della stessa, spingendo la cellula verso la necrosi in condizioni di severa carenza energetica. Il concetto di un livello critico di ATP come interruttore tra apoptosi e necrosi è stato supportato mediante la manipolazione della concentrazione di ATP intracellulare, adoperando inibitori sia della produzione mitocondriale di ATP, sia della via glicolitica (oligomicina e deossiglucosio, rispettivamente). Riduzioni temporanee (3h) e reversibili dei livelli di ATP oltre un valore soglia circa del 30% inducono nelle cellule l'apoptosi, in assenza di altri stimoli da stress. Una perdita parziale di ATP per periodi di tempo più lunghi (6h) o una deplezione quasi completa dell'ATP per periodi di tempo molto brevi provocano necrosi. Analogamente, una temporanea deprivazione del glucosio ha

come risultato prevalente la morte per necrosi di cardiomiociti trattati con staurosporina, mentre in condizioni di abbondanza di ATP viene ripristinato il fenotipo apoptotico. In entrambi i casi si sono messe in evidenza le caratteristiche tipiche dell'MTP (Fig. 6) [55].



**Fig.6:** Schema che illustra il coinvolgimento del mitocondrio in diversi processi di morte cellulare.

## FATTORI DI MORTE RILASCIATI DAL MITOCONDRIO

Come accennato in precedenza, l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi, prevede il coinvolgimento dei membri proapoptotici della famiglia Bcl-2. La formazione del poro sulla membrana esterna

costituito da Bak e Bax porta infatti alla fuoriuscita di una serie di fattori proapoptotici: citocromo *c*, SMAC/DIABLO, HtrA2/Omi, l'endonucleasi G, AIF.

Il citocromo *c* è un fondamentale fattore della fosforilazione ossidativa, coinvolto nel trasporto degli elettroni dal complesso III al complesso IV. Quando viene rilasciato nel citoplasma, esso interagisce con la proteina APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) e la procaspasi 9, dando luogo al complesso multiproteico chiamato apoptosoma. Tale complesso porta all'attivazione della procaspasi 9 in caspasi-9, mettendo in moto una cascata di eventi proteolitici che conducono la cellula all'apoptosi [56].

SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase o Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI) è una proteina codificata da un gene nucleare, fornita del segnale di destinazione mitocondriale (MTS) all'estremità N-terminale, che viene rimosso nella forma matura del fattore. Rilasciata nel citosol in seguito a stimoli apoptotici, SMAC/DIABLO favorisce il progresso dell'apoptosi stessa interagendo con diverse proteine IAP (Inibitori delle Proteine Apoptotiche) e favorendo il rilascio delle caspasi da quest'ultime. In particolare è stato dimostrato come omodimeri di SMAC/DIABLO interagiscano coi domini BIR2 e BIR3 di XIAP

favorendo rispettivamente il rilascio della Caspasi-3 e della Caspasi-9 [57].

HtrA2 (High Temperature Requirement Factor A 2), anche nota come Omi, è il membro meglio caratterizzato della famiglia di serin-proteasi HtrA, il cui ruolo fisiologico all'interno dello spazio intermembrana mitocondriale, consiste nel garantire il corretto folding di diverse proteine. In presenza di stimoli apoptotici, HtrA2/Omi è rilasciata dal nucleo, dove contrasta l'attività inibitoria esercitata dalle IAP sulle caspasi, interagendovi mediante il proprio dominio N-terminale ed esercitando su di esse la propria attività proteolitica [58].

L'endonucleasi G (o EndoG) è una nucleasi nucleare che risiede normalmente nello spazio intermembrana. Dopo la MOMP, EndoG trasloca al nucleo, dove media la frammentazione del DNA oligonucleosomale, indipendentemente dalle caspasi. È importante ricordare che EndoG è anche coinvolta in fenomeni di ricombinazione del DNA e che la sua mancanza riduce la proliferazione cellulare, favorendo l'arresto delle cellule nella fase G<sub>2</sub> del ciclo. Considerando che i meccanismi di riparo del DNA ricombinazione-dipendenti sono essenziali per la sopravvivenza delle cellule tetraploidi, l'abbattimento di EndoG può condurre alla morte di cellule tumorali tetraploidi [59].

AIF (Fattore d'Induzione dell'Apoptosi) è una proteina molto antica filogeneticamente essenziale per la sopravvivenza. Esso è sintetizzato

da un gene nucleare come precursore immaturo con un segnale di localizzazione mitocondriale (MLS) N-terminale di circa 100 aminoacidi. Prima dell'ingresso nel mitocondrio l'MLS è rimosso e AIF attraversa la membrana interna mediante un dominio transmembrana N-terminale. Il resto della proteina, che assume un nuovo ripiegamento e incorpora un nucleotide flavino adeninico come gruppo prostetico necessario per la sua attività NADH ossidasica, è rivolto verso lo spazio intermembrana. In seguito a MOMP, AIF trasloca dal mitocondrio al citosol ed è successivamente importato nel nucleo (insieme al suo necessario cofattore, la Ciclofilina A), dove provoca condensazione cromatinica e degradazione del DNA [60]. Analisi mutazionali e biochimiche di AIF, indicano che le sue funzioni apoptotiche e redox risiedono in porzioni distinte della proteina, rispettivamente nella porzione C-terminale (567-609), e la regione di legame al NAD (322-333) [61]. La perdita di AIF provoca difetti della fosforilazione ossidativa, principalmente in seguito a regolazione negativa dei componenti del complesso I della catena respiratoria. È noto che cellule con un'espressione ridotta o nulla di AIF sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo, in linea con dati che indicano che AIF ha una funzione antiossidante [62].

## **MITOCONDRI E CELLULE TUMORALI**

Per sintetizzare l'ATP necessario alla vita cellulare mediante la fosforilazione ossidativa, i mitocondri consumano la maggior parte dell'ossigeno cellulare, con una notevole produzione collaterale di ROS. Tali molecole sono state implicate nell'eziologia della carcinogenesi, sia attraverso il danneggiamento di macromolecole, che attraverso la modulazione di vie di segnalazione mitogeniche. Inoltre, numerose disfunzioni mitocondriali d'origine genetica sono state implicate in un ampio spettro di malattie relative all'età, inclusi i tumori [63]. Il rapporto tra il mitocondrio e la malattia tumorale non è stato ancora delucidato del tutto, ma riveste una notevole importanza, non solo per via della loro funzione energetica (e conseguente produzione di ROS), ma anche perché i mitocondri hanno un ruolo centrale nella regolazione dei processi di morte cellulare. In particolare, va notato come le cellule tumorali possono assumere resistenza all'apoptosi e altre forme di morte cellulare programmata mediante svariati meccanismi, che includono disfunzioni mitocondriali, espressione di proteine antiapoptotiche e regolazione negativa o mutazione di proteine proapoptotiche [64].

Molteplici studi attestano che numerose linee tumorali hanno un metabolismo del glucosio accelerato in confronto alle normali cellule differenziate (effetto Warburg), un fenomeno attualmente adoperato

per l'identificazione e la diagnosi dello stadio sia di carcinomi solidi che di patologie ematiche. Sebbene i meccanismi regolatori sottesi ai pathway glicolitici e aerobici di produzione energetica siano complessi, rendendo predizioni su specifiche risposte cellulari alquanto difficili, i dati attuali suggeriscono che per favorire la produzione di biomassa, le cellule in proliferazione sono solitamente pronte a soddisfare le richieste energetiche utilizzando substrati alternativi all'ossidazione completa del glucosio. In particolare, solo una percentuale compresa tra il 40 e il 75% dell'ATP necessario alle cellule è generato mediante il catabolismo del glucosio a piruvato/lattato nel citoplasma e il rimanente ATP è sintetizzato nei mitocondri mediante il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e l'associata fosforilazione ossidativa che rigenera  $\text{NAD}^+$  e  $\text{FAD}^+$ . Successivamente, è stato osservato in cellule di glioblastoma che il flusso del ciclo dei TCA è sostenuto significativamente dalle reazioni anaplerotiche dell'intermedio  $\alpha$ -chetoglutarato prodotto a partire dalla glutammina e dalle moiesi acetiliche derivate dalla reazione della piruvato deidrogenasi quando il piruvato ha origine da fonti alternative al glucosio [65].

Di particolare rilevanza per gli studi sulle modifiche del metabolismo delle cellule tumorali è l'esochinasi II. Quest'enzima è fortemente regolato positivamente in molti tumori, essendo il suo promotore

genico sensibile a tipici fattori di trascrizione come HIF-1 e p53. Esso ha un ruolo di controllo sia sul metabolismo che sulla biosintesi di molecole necessarie per la proliferazione delle cellule tumorali. Esso fosforila il glucosio mediante l'ATP sintetizzato nel mitocondrio e rilascia l'ADP prodotto in prossimità del traslocatore nucleotidico adeninico (ANT) per favorire la nuova sintesi di ATP all'interno della matrice. Ovviamente, i livelli d'espressione, la locazione, l'affinità per il substrato e la cinetica dell'enzima sono cruciali per il bilanciamento del metabolismo del glucosio, per indirizzare intermedi dell'ossidazione del glucosio verso la produzione di metaboliti necessari per la crescita tumorale o associare la glicolisi citoplasmatica con un'ulteriore ossidazione del piruvato attraverso il ciclo del TCA. Ciò sarebbe possibile se l'attività esochinasica legata ai mitocondri fosse ridotta e/o se essa limitasse la disponibilità di ADP nella matrice mitocondriale, inibendo il ciclo del TCA. Sebbene l'esatto meccanismo sia ad oggi elusivo, è stato dimostrato che un'elevata segnalazione da parte di chinasi oncogeniche favorisce il legame dell'enzima a VDAC, per mezzo di una fosforilazione dipendente da AKT [66]. VDAC è un complesso proteico della membrana mitocondriale esterna situato in prossimità di ANT che scambia l'ADP con l'ATP attraverso la membrana mitocondriale interna. Tuttavia, l'enzima può anche essere separato dalla membrana



mitocondriale e ridistribuito nel citosol, ad opera dell'attività catalitica della sirtuina-3, che deacetila la ciclofilina D, proteina della membrana mitocondriale interna necessaria per il legame dell'esochinasi II a VDAC. La rimozione dell'esochinasi dalla membrana mitocondriale ha anche un altro effetto rilevante per le cellule tumorali: l'induzione dell'apoptosi. Tutte queste informazioni indicano che l'esochinasi II è un enzima che nelle cellule tumorali è adoperato per sopravvivere e proliferare in condizioni avverse, inclusa l'ipossia, rendendola un bersaglio interessante per l'induzione di citotossicità nelle cellule. Infatti, un'interferenza stabile mediante RNA del gene per l'esochinasi II ha provocato un incremento nell'indice di apoptosi e inibito la crescita di cellule di carcinoma umano del colon ed esperimenti condotti *in vivo* hanno mostrato una riduzione della crescita tumorale [67].

Sebbene le cellule tumorali possano avere una capacità di utilizzare l'ossigeno estremamente diversificata in diverse condizioni (quali ipossia, attivazione di oncogeni, mutazioni del DNA mitocondriale), ad oggi sono stati riportati pochi casi di stretta associazione tra modifiche metaboliche e composizione e attività dei complessi mitocondriali. Nell'oncocitoma renale e nel carcinoma epidermoide sono stati evidenziati una ridotta attività della NADH deidrogenasi e calo del contenuto proteico del Complesso I. Inoltre, un simile

decremento dell'attività del Complesso I è stata attribuita a una specifica mutazione nel gene ND1 presente nel DNA mitocondriale in una linea cellulare di oncocitoma tiroideo [68]. In cellule di carcinoma renale è stato osservato come un ridotto contenuto di ATP sintasi sembri indicare uno stato strutturalmente e funzionalmente inefficiente per i mitocondri. Tuttavia, non si può escludere che in alcuni casi l'alterazione strutturale dell'ATP sintasi possa offrire un vantaggio funzionale a cellule che presentano una catena respiratoria difettiva, mantenendo il  $\Delta\psi_m$  [69]. È probabile che un basso livello di ATP sintasi possa avere un ruolo rilevante nel metabolismo delle cellule tumorali, poiché è stato riportato che in tumori di diversa provenienza tissutale la carcinogenesi ha un effetto specifico sull'espressione della subunità  $\beta$  dell' $F_1$ -ATPasi, suggerendo alterazioni nel meccanismo di controllo del differenziamento mitocondriale. Al contrario, l'inibitore dell'ATP sintasi  $IF_1$  risulta overespresso in linee tumorali di epatocarcinoma e sarcoma di Yoshida. È possibile che la sua funzione (come nelle cellule normali) sia quella di evitare un'eccessiva idrolisi dell'ATP, limitando l'incremento del  $\Delta\psi_m$ , ma la ridotta presenza di ATP sintasi nelle cellule tumorali e l'alta affinità di  $IF_1$  per l'enzima contrastano quest'ipotesi. Una seconda ipotesi suggerisce che le cellule tumorali possano avere necessità di una fosforilazione ossidativa fortemente

ridotta per adattare il proprio metabolismo e acquisire un vantaggio selettivo in condizioni ambientali avverse, quale l'ipossia [70]. Infine, IF<sub>1</sub> può contribuire al mantenimento strutturale della membrana mitocondriale interna, poiché è stata riportata la sua capacità di stabilizzare l'oligomerizzazione dell'ATP sintasi, che può determinare a sua volta la forma delle creste [71].

### **L'OSTEOSARCOMA E LA LINEA MG63**

L'osteosarcoma è la tipologia più diffusa di tumore solido delle ossa, caratterizzato da un'insorgenza prevalente in soggetti di sesso maschile in età compresa tra i 10 e i 30 anni, suggerendo una correlazione tra l'insorgenza della malattia e il periodo di maggiore crescita ossea. In media, circa 6 bambini su un milione e 2 adulti su un milione sviluppano questa malattia [72]. L'osteosarcoma si origina prevalentemente in ossa lunghe, in particolare nel femore distale e nella tibia prossimale. È un tumore solitamente molto aggressivo, che presenta metastasi in circa l'80% dei pazienti, già alla prima diagnosi. Comunemente, l'osteosarcoma provoca metastasi al polmone, ma sono comuni anche metastasi locali o in altre sedi ossee. Ai raggi-X, l'osteosarcoma spesso appare come un tumore associato a un disgregamento osseo osteolitico ed osteoblastico combinato con una massa tissutale soffice. Gli osteosarcomi possono essere classificati

istologicamente in tre categorie: osteoblastici, condroblastici e fibroblastici. Tali categorie presentano significative differenze nell'espressione di molteplici geni [73]. Si ritiene che l'osteosarcoma abbia origine da cellule staminali mesenchimali (MSC) o da cellule osteoprogenitrici, in seguito ad alterazioni della via di differenziazione degli osteoblasti. L'instabilità genetica dell'osteosarcoma rende difficile identificare le cause del suo sviluppo. È stato proposto un ruolo nello sviluppo dell'osteosarcoma per molteplici vie di segnalazione e mutazioni, incluse la regolazione negativa della via di Wnt e l'inattivazione genetica di p53 e pRB, tuttavia non è stato dimostrato che alcuna di queste alterazioni sia la causa principale dell'osteosarcoma [74]. Tra i fattori di rischio per questa malattia vi sono la sindrome di Paget e l'esposizione a radiazioni, nonché la somministrazione di farmaci adoperati nella chemioterapia di altri tumori [75]. Tra i geni sovraespressi in cellule di osteosarcoma rispetto a normali osteoblasti vi sono RECQL4, SPP1, RUNX2 e IBSP, mentre si osserva un'espressione ridotta di DOCK5, CDKN1A, RB1, p53 e LSAMP. In particolare vanno notate anomalie genetiche specifiche a carico del gene oncosoppressore p53 e la delezione del gene oncosoppressore del retinoblastoma (RB1). In un'alta percentuale di casi è stata inoltre riscontrata un'amplificazione di MDM2 (murine double minute 2) e CDK4 (cyclin dependent

kinase 4) e l'attivazione costitutiva delle vie di segnalazione regolate da fattori di crescita IGF-1 e PDGF. Va anche notato come l'incrementata espressione di RUNX2 possa essere messa in relazione con la resistenza del tumore ai farmaci chemioterapici comunemente usati. Nei casi più gravi si osserva anche un elevato livello di espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p21/WAF1[76].

Sin dal 1970 il trattamento più diffuso per l'osteosarcoma consiste nella rimozione chirurgica combinata a chemioterapia. Le terapie maggiormente adoperate prevedono cisplatino e doxorubicina pre- e post-operatoria con o senza alte dosi di metotrexato, e/o ifosfamida. In molti pazienti si verifica resistenza all'attuale terapia e ricorrenza del tumore. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti è fermo al 70% in pazienti che non sviluppano metastasi, percentuale molto inferiore per coloro che le presentano [77].

Tra le linee cellulari adoperate sperimentalmente per lo studio dell'osteosarcoma, nel presente studio sono state adoperate le cellule MG-63. Tale linea è caratterizzata dalla perdita degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti p14 e p16, a causa di una delezione che interessa il locus genico INK4a/ARF. Inoltre tali cellule presentano un'unica copia allelica non espressa (a causa della metilazione del promotore) del gene oncosoppressore p53, con conseguente assenza completa dell'azione del fattore. Inoltre, in questo sistema

sperimentale, è stata dimostrata l'iperfosforilazione e conseguente inattivazione dell'oncosoppressore pRb [78].

## **MATERIALI E METODI**

### **CONDIZIONI DI COLTURA DELLE CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG63**

Le cellule MG63 vengono coltivate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> in presenza di terreno di coltura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), arricchito con siero bovino fetale (FBS) al 10% inattivato al calore (56°C per 30 minuti), glutammina 1mM e antibiotico antimicotico (miscela di penicillina-streptomicina 0.5%). Le cellule sono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C, in un'atmosfera costituita da 95% di aria e 5% di anidride carbonica. Le cellule MG63 crescono adese al substrato di plastica delle fiasche disponendosi in monostrato.

Per studiare gli effetti dei composti, le cellule, dopo distacco con tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina; 1 mg/ml EDTA), sono state seminate su piastre da 6 pozzetti (9 x 10<sup>5</sup> cellule/2ml di terreno di coltura) o da 96 pozzetti (5 x 10<sup>3</sup> cellule/200µl di terreno di coltura). Al termine del piastramento, si è lasciato che le cellule aderissero al

substrato (incubazione a 37°C) ed dopo 24 h sono state trattate con i composti.

Le soluzioni di Partenolide e Ciclosporina A sono state preparate in dimetilsolfossido (DMSO) e sono state rispettivamente diluite in terreno di coltura alla concentrazione finale 25  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. La concentrazione finale di DMSO non supera mai lo 0.04%, concentrazione oltre la quale il DMSO può risultare tossico per le cellule. Lo z-VAD è stato acquistato come soluzione in DMSO (INSERIRE) ed è stato diluito alla concentrazione finale 100  $\mu$ M nel terreno di coltura. La soluzione di N-acetilcisteina (NAC) è stata preparata direttamente in terreno di coltura alla concentrazione 10  $\mu$ M. La soluzione di 5-idrossidecanoato (5HD) è stata preparata in H<sub>2</sub>O e diluita successivamente in terreno di coltura alla concentrazione finale 400  $\mu$ M. La soluzione di acido 4,4'-Diisothiociano-2,2'-stilbenedisulfonico (DIDS) è stata preparata in bicarbonato 0.1M pH 8.0 e diluita in terreno di coltura alla concentrazione finale 500  $\mu$ M.



## **OSSERVAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE, DELLO STATO DI CONDENSAZIONE DELLA CROMATINA E DELLA FRAMMENTAZIONE CELLULARE MEDIANTE MICROSCOPIA A FLUORESCENZA**

Le cellule MG63 seminate per una notte su piastre multiwell da 96 pozzetti sono state incubate con Hoechst 33342 2.5 µg/ml per circa 30 minuti. L'Hoechst 33342 è un composto fluorescente intercalante il DNA, dotato di bassa tossicità, che permette di seguire nel tempo lo stato di condensazione della cromatina. Se questa è poco concentrata, infatti, il composto darà una fluorescenza diffusa nel nucleo cellulare e piuttosto tenue, mentre in caso di condensazione cromatinica, la colorazione risulta più intensa e concentrata in una superficie ridotta. I picchi di eccitazione ed emissione per questo fluorocromo sono rispettivamente di 360 nm e di 495 nm. Al termine dell'incubazione il terreno contenente l'Hoechst 33342 viene allontanato e i pozzetti sono sottoposti a un lavaggio in PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM, pH 7.4). Successivamente vengono nuovamente aggiunti 200 µl di terreno e le cellule vengono trattate con i diversi composti e osservate mediante microscopio ottico tanto in campo chiaro (per osservarne la morfologia cellulare), quanto in fluorescenza alla lunghezza d'onda di 495 nm (per valutare lo stato di condensazione della cromatina) utilizzando un ingrandimento 20X

o 40X. Le osservazioni sono state condotte già a 30 minuti di trattamento e sono state ripetute ogni 15 minuti, fino a un tempo di 2 ore. Dopo aver accertato la presenza di effetti tossici da parte del PN (sia per quanto riguarda la morfologia che per quanto concerne la condensazione della cromatina) è stata effettuata un'analisi per verificare se le cellule trattate presentassero frammentazione del DNA. A tale scopo è stata adoperata una colorazione mediante ioduro propidio (PI), fluorocromo che si intercala nel DNA, i cui picchi d'assorbimento ed emissione sono rispettivamente a 488 e 575 nm. Tale composto, infatti, non è in grado di penetrare all'interno delle cellule, a meno che la loro membrana sia danneggiata. Lo ioduro propidio è stato aggiunto a ciascun pozzetto in concentrazione 2  $\mu$ M e le cellule sono state nuovamente osservate mediante microscopia in fluorescenza dopo 20 minuti d'incubazione col composto. Le immagini ottenute mediante campo chiaro e colorazione con Hoechst 33342 sono state sovrapposte adoperando il software Leica QFluoro. In parallelo la procedura è stata effettuata su cellule seminate in multiwell da 96 pozzetti e non sottoposte a trattamento. Tutti i dati sono stati acquisiti con un microscopio Leica DM IRB con telecamera DC 300F ed elaborati utilizzando il software Leica QFluoro.

## **DISTRIBUZIONE CELLULARE LUNGO LE FASI DEL CICLO CELLULARE**

La distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo cellulare è stata determinata per citofluorimetria di flusso come riportato da Krishan [79]. Il composto adoperato per lo studio del ciclo cellulare è lo ioduro di propidio (PI), precedentemente descritto.

Al fine di permettere allo ioduro propidio di penetrare nel nucleo, le cellule vengono lisate con una soluzione ipotonica, trattamento che lascia intatta la membrana nucleare.

In una popolazione cellulare, le cellule possiedono quantità diverse di DNA in rapporto alla fase del ciclo cellulare in cui si trovano. La fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> è quella in cui le cellule possiedono un corredo cromosomico diploide (2N). Dopo la sintesi del DNA nella fase S, le cellule entrano in fase G<sub>2</sub>/M e, prima della citodieresi, presentano un quantitativo doppio di DNA (fase tetraploide 4N). Poiché l'intensità della fluorescenza è proporzionale alla quantità di PI che si intercala nel DNA, quindi alla quantità del DNA stesso, le cellule in fase G<sub>2</sub>/M manifestano una fluorescenza pressoché doppia rispetto a quella di cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Nell'ambito di questo studio, tale tecnica è stata impiegata per valutare il tipo di meccanismo di morte in atto nelle cellule trattate con partenolide. Lo ioduro di propidio si intercala in minor quantità

nel DNA frammentato e nella cromatina condensata, pertanto le cellule in apoptosi presentano una fluorescenza ridotta rispetto alle cellule in fase G0/G1 che si manifesta nel tracciato citofluorimetrico con la presenza di una popolazione cellulare in fase preG0/G1.

Per tale analisi, le cellule MG63 sono state seminate su piastre da 6 pozzetti come precedentemente descritto e, dopo incubazione con PN, sono state prelevate, lavate in PBS, risospese in una soluzione ipotonica di PI (ioduro di propidio 50 µg/ml, sodio citrato 0.1%, RNAsi 100 µg/ml, Nonidet P-40 0.1%) e incubate al buio a 4°C per 1 ora. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata con l'uso di un citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL). I dati acquisiti sono stati elaborati con il software Expo32.

## **MISURA DEI ROS INTRACELLULARI**

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule trattate con diversi composti è stata misurata usando 2',7'-diclorodihidrofluoresceinadiacetato (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR), una sonda non fluorescente che entra dentro la cellula in virtù delle proprie caratteristiche lipofile, conferite dai gruppi acetilici. La rimozione dei gruppi acetato da parte delle esterasi intracellulari e la successiva ossidazione da parte dei ROS converte la molecola in un composto fluorescente rilevabile mediante

citofluorimetria, i cui picchi d'eccitazione ed emissione sono rispettivamente a 488 nm e 525 nm. Cellule seminate in una piastra multiwell da 6 pozzetti sono state trattate con PN e/o 5-HD. Successivamente sono state rimosse mediante tripsina dal supporto cui erano adese, lavate con buffer HBSS/Ca/Mg (NaCl 0.137M, KCl 5.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.41 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM, D-Glucosio 5.56 mM, pH 7.3) e incubate con H<sub>2</sub>DCFDA 5 µM a 37°C per 30 min. A seguito dell'incubazione le cellule sono state analizzate adoperando un citofluorimetro FACScan (Beckman Coutler Epics XL) e i dati sono stati elaborati adoperando il software Expo2. La procedura è stata applicata anche a cellule controllo non trattate.

## **MISURA DEL CALCIO INTRACELLULARE**

Il rilascio dello ione calcio nel citosol da parte delle cellule trattate con diversi composti è stato monitorato mediante colorazione con l'estere tetrakis(acetossimetil) acido 4-(6-Acetossimetossi-2,7-dicloro-3-osso-9-xantenil)-4'-metil-2,2'-(etilene-diossi)dianilineN,N,N',N'-tetraacetico, anche noto come Fluo 3-AM, una sonda non fluorescente che entra dentro la cellula, dove l'estere è idrolizzato in maniera Calcio dipendente rilasciando l'effettivo fluorocromo i cui picchi d'eccitazione ed emissione sono rispettivamente a 506 nm e

526 nm. Cellule seminate in una piastra multiwell da 6 pozzetti sono state trattate con PN. Al termine del trattamento, le cellule sono state rimosse mediante tripsina dal supporto cui erano adese, lavate in PBS e incubate con Fluo 3-AM 10  $\mu$ M a 37°C per 60 min. A seguito dell'incubazione le cellule sono state analizzate adoperando un citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL) e i dati sono stati elaborati adoperando il software Expo2. La procedura è stata applicata anche a cellule di controllo non trattate.

## **VALUTAZIONE DEI GRUPPI SULFIDRILICI TOTALI**

Per la valutazione dei gruppi sulfidrilici totali intracellulari è stata utilizzata una tecnica spettrofotometrica che impiega il 5,5'-ditio-bis(acido 2-nitrobenzoico), anche noto come DTNB o reagente di Ellman. I gruppi tiolici reagiscono con questo composto, tagliando il ponte disolfuro e producendo 2-nitro-5tiobenzoato (NTB<sup>-</sup>), che si ionizza nel dianione NTB<sup>2-</sup> in acqua a pH neutri o alcalini. Tale dianione ha un colore giallo il cui picco d'assorbanza è a 412 nm. Cellule seminate in una piastra multiwell da 6 pozzetti sono state trattate con PN per i tempi indicati nei risultati. Al termine dell'incubazione, cellule di controllo e cellule esposte al trattamento sono state rimosse mediante tripsina dal supporto cui erano adese e lavate con PBS. I pellet ottenuti sono stati risospesi nell'apposito

buffer di diluizione (Tris-HCl 30 mM, EDTA 3mM, pH 8.2) nel rapporto  $3 \times 10^5$  cellule/50  $\mu$ l. Alla diluizione sono stati aggiunti 25  $\mu$ l di DTNB (29.7 mg in 25 ml di metanolo), 25  $\mu$ l del buffer di diluizione e 400  $\mu$ l di metanolo. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati a temperatura ambiente per 5 minuti a 3000 x g. Al termine, 50  $\mu$ l di ciascun sovranatante sono stati trasferiti in una piastra multiwell da 96 pozzetti per eseguire lettura spettrofotometrica mediante un lettore per piastre ELISA Opsys MR (Dynex Technologies), misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 412 nm. I valori ottenuti sono stati confrontati con una curva standard di N-acetilcisteina (NAC) preparata con quantità variabili da 5 a 20 nmoli.

## **VALUTAZIONE DEI GRUPPI SULFIDRILICI LIBERI**

Per la valutazione dei gruppi sulfidrilici liberi intracellulari è stata utilizzata una tecnica spettrofotometrica che impiega il 5,5'-ditio-bis(acido 2-nitrobenzoico), anche noto come DTNB o reagente di Ellman (vedere paragrafo precedente per le caratteristiche del composto). Per la valutazione dei gruppi sulfidrilici liberi è necessario effettuare una precipitazione delle proteine. Cellule seminate in una piastra multiwell da 6 pozzetti sono state trattate con PN per i tempi riportati nei risultati. Al termine dell'incubazione, cellule controllo e

cellule esposte al trattamento sono state rimosse mediante tripsina dal supporto cui erano adese e lavate in PBS. I pellet ottenuti sono stati risospesi nell'apposito buffer di diluizione (Tris-HCl 30 mM, EDTA 3mM, pH 8.2) nel rapporto  $3 \times 10^5$  cellule/50  $\mu$ l, cui vengono aggiunti 25  $\mu$ l di TCA al 10% in H<sub>2</sub>O. Le cellule sono state quindi centrifugate per 15 min a temperatura ambiente a 200 x g. 50  $\mu$ l dei sovrantanti ottenuti sono stati trasferiti in una piastra multiwell da 96 pozzetti, cui sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di Tris-HCl pH 8.9 1M e 20  $\mu$ l di DTNB. È stata quindi eseguita la lettura spettrofotometrica mediante un lettore per piastre ELISA Opsys MR (Dynex Technologies), misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 412 nm. I valori ottenuti sono stati confrontati con una curva standard di N-acetilcisteina (NAC) in quantità variabili da 0.5 a 10 nmoli.

## **VALUTAZIONE DEL GLUTATIONE RIDOTTO INTRACELLULARE**

Per la valutazione del glutathione ridotto (GSH) intracellulare è stata utilizzata una tecnica spettrofotometrica che impiega un kit (BIOXYTECH GSH-400 Assay, acquistato presso la *OxisResearch*, costituito da un buffer e due reagenti denominati rispettivamente Solution 3, R1 e R2), contenente DTNB. Cellule seminate in una piastra multiwell da 6 pozzetti sono state trattate con PN per i tempi



indicati nei risultati e successivamente sono state rimosse mediante tripsina dal supporto cui erano adese e lavate in PBS. I pellet ottenuti sono stati risospesi in acido metafosforico (5g/100ml H<sub>2</sub>O). Le cellule sono state pertanto omogenate con pipette pasteur e congelate per 5 minuti a -80 °C. Tale procedimento è stato ripetuto per due volte. Al termine gli omogenati sono stati centrifugati per 10 minuti a temperatura ambiente a 3000 x g. In seguito, 25 µl di ciascun sovranatante sono stati aggiunti a 155 µl della Solution 3 già presenti in un una multiwell da 96 pozzetti. A tale diluizione sono stati aggiunti 10 µl di un reagente R1 e 10 µl di un reagente R2, entrambi forniti dal kit. Dopo un'incubazione di 10 minuti, è stata effettuata la lettura la lettura dei campioni utilizzando un lettore per piastre ELISA Opsys MR (Dynex Technologies) ad un valore d'assorbaza di 412 nm. I valori ottenuti sono stati confrontati con una curva standard di GSH preparata utilizzando quantità variabili da 2 a 20 nmoli.

## **VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE**

La valutazione del potenziale della membrana mitocondriale è stata condotta utilizzando il 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina ioduro (JC-1, Molecular Probes, Cayman Chemical Company), un derivato della carbocianina. Il JC-1 è un

colorante metacromatico che, una volta penetrato nelle cellule, tende a seguire il potenziale di membrana mitocondriale e a concentrarsi nella matrice mitocondriale. Il JC1, forma aggregati reversibili (detti aggregati J) se raggiunge una concentrazione eccessivamente elevata, condizione che si verifica solo all'interno di mitocondri con potenziale integro. La depolarizzazione della membrana mitocondriale limita fortemente la migrazione alla matrice mitocondriale e la conseguente formazione d'aggregati da parte del JC-1 e fa sì che vi sia pertanto una prevalenza della forma monomerica. I picchi d'eccitazione ed emissione del JC-1 sono rispettivamente a 490 nm e 527 nm, se il composto è in forma monomerica, o 590, se esso forma aggregati. Dal rapporto tra le intensità di emissione del composto nelle due diverse lunghezze d'onda è pertanto possibile valutare lo stato del potenziale della membrana mitocondriale. Cellule seminate in una piastra multiwell da 96 pozzetti sono state trattate con diversi composti per 2 ore. Il colorante, fornito dal kit (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit) sotto forma di soluzione a concentrazione e solvente ignoti (JC-1 Reagent), viene diluito 1:10 in un buffer fornito dal kit (Cell Based Assay Buffer). Tale diluizione è stata aggiunta alle cellule (100 µl/ml di terreno di coltura) e, dopo 30 minuti di incubazione ne è stata verificata l'incorporazione, osservando le cellule al microscopio

a fluorescenza, utilizzando un ingrandimento 20X e 40X. È stata quindi visualizzata l'incorporazione del JC-1 sotto forma di aggregati o in forma monomerica utilizzando i filtri relativi ai rispettivi spettri d'emissione e le immagini acquisite sono state sovrapposte per valutare la fluorescenza prevalente. Tale protocollo è stato applicato in parallelo a cellule non trattate con alcun composto, come controllo. Tutti i dati sono stati acquisiti con un microscopio Leica DM IRB con telecamera DC 300F ed elaborati utilizzando il software Leica QFluoro.

## **VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI AIF MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA**

Per monitorare la localizzazione intracellulare di AIF è stato adoperato un protocollo d'immunofluorescenza per mezzo di un anticorpo monoclonale di *rabbit* specifico per la proteina (Abcam), associato alla localizzazione dei nuclei cellulari mediante colorazione con Hoechst33342. Cellule seminate in una piastra multiwell da 96 pozzetti, i cui nuclei sono stati colorati mediante Hoechst33342, sono state trattate con PN per un tempo pari a 2 ore. Successivamente, è stato rimosso il terreno di coltura e sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS. In seguito le cellule sono state incubate per 3 min in una soluzione di fissaggio (formaldeide 3% e sodio azide 0.05% in PBS).

Dopo 3 ulteriori lavaggi in PBS, le cellule sono state messe in una soluzione permeabilizzante (Triton-X100 0.1% e sodio azide 0.05% in PBS). Al termine le cellule sono state incubate per una notte a 4°C al buio con una diluizione di anticorpo anti-AIF a una concentrazione finale 0.01 µg/100 µl in soluzione di blocking (BSA 1% e sodio azide 0.05% in PBS). Successivamente sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS, cui è seguita l'incubazione per 1h a 4°C al buio con anticorpo secondario *anti-rabbit* policlonale di *goat* diluito nella soluzione di blocking a una concentrazione finale 1 µg/3 ml in soluzione di blocking. Al termine dell'incubazione, l'eccesso di anticorpo secondario non coniugatosi è stato rimosso mediante un lavaggio in PBS. L'anticorpo secondario adoperato è coniugato a fluoresceina, che ne permette la rilevazione mediante fluorescenza con picchi d'eccitazione ed emissione rispettivamente a 494 nm e 521 nm. Per l'osservazione al microscopio le cellule sono state lasciate in PBS e sono state acquisite immagini tanto dei nuclei cellulari colorati mediante Hoechst33342, quanto della colorazione dovuta dall'anticorpo secondario, adoperando un ingrandimento di 20X e di 40X. Tale protocollo è stato applicato in parallelo a cellule non trattate con alcun composto, come controllo. Tutti i dati sono stati acquisiti con un microscopio Leica DM IRB con telecamera DC 300F ed elaborati utilizzando il software Leica QFluoro.

## **RISULTATI**

### **IL TRATTAMENTO CON PARTENOLIDE È IN GRADO DI INDURRE MORTE CASPASI INDIPENDENTE IN CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG63**

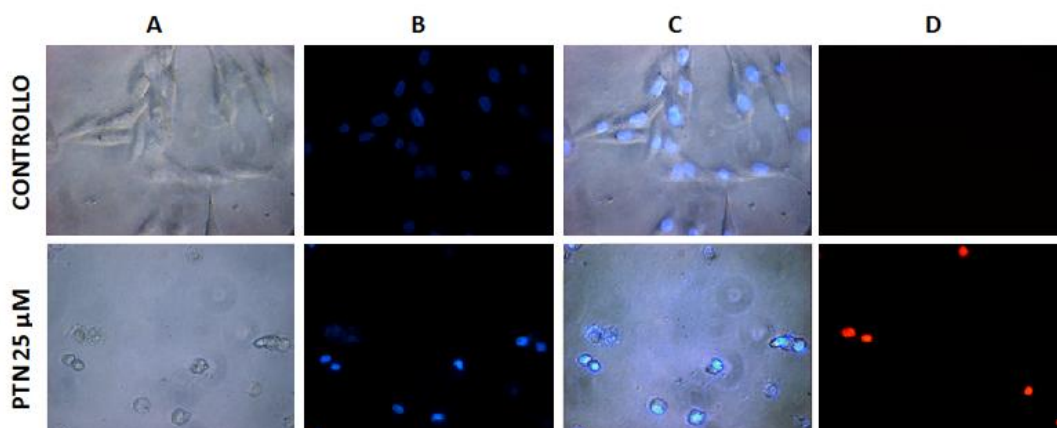
Nella fase iniziale di questo studio sono state condotte delle analisi finalizzate alla valutazione degli effetti citotossici indotti dal trattamento con basse concentrazioni di PN (25  $\mu$ M) sulla linea cellulare di osteosarcoma umano MG63, mediante l'uso di un microscopio ottico. Dopo incubazione con PN, le cellule sono state osservate in campo chiaro per valutare gli effetti del composto sulla morfologia. Come si può osservare nella Fig. 7A, le cellule trattate per 2 h col composto mostrano rispetto al controllo una morfologia profondamente alterata e tendono a distaccarsi dal supporto di crescita. Dalle analisi condotte per microscopia a fluorescenza è stato invece possibile valutare lo stato dei nuclei dopo colorazione con Hoechst 33342. È possibile infatti osservare come il trattamento con PN provochi un consistente fenomeno di condensazione della

cromatina (Fig. 7B). Tale effetto non si osserva invece nelle cellule di controllo non trattate.

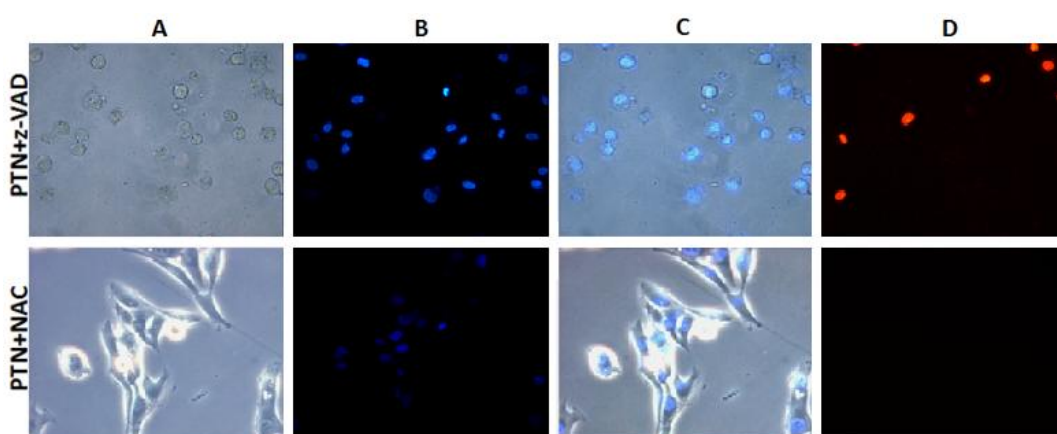
Per meglio caratterizzare il meccanismo di morte messo in atto dal partenolide nel nostro sistema sperimentale e verificare la presenza di necrosi, abbiamo altresì sottoposto le cellule a colorazione mediante Ioduro di Propidio (PI, Fig. 7D), un intercalante degli acidi nucleici che può essere visualizzato mediante osservazione al microscopio a fluorescenza. Come si può osservare, un numero estremamente ridotto di cellule trattate dà una risposta positiva al trattamento con PI, indice che il meccanismo di morte messo in atto non prevede frammentazione cellulare e necrosi.

Poiché è noto che il PN può indurre morte cellulare mediante più meccanismi diversi tra loro, sono state ripetute le osservazioni al microscopio, in presenza due composti (Fig. 8): z-VAD<sup>tmk</sup>, un inibitore generale delle caspasi. Come si può vedere nella Fig. 2, l'esperimento ha messo in evidenza come l'inibitore delle caspasi z-VAD non sia in grado di contrastare gli effetti esplicati dal partenolide sulla morfologia cellulare né tantomeno sulla condensazione della cromatina, suggerendo pertanto che il meccanismo di morte indotto dal PN sia caspasi-indipendente. Nella stessa Fig. 8 sono riportati gli effetti del PN in presenza di N-acetilcisteina (NAC), un noto agente antiossidante. Come è possibile

osservare, l'aggiunta di NAC alle cellule MG63 trattate con PN è in grado di prevenire completamente gli effetti citotossici del PN, suggerendo l'esistenza di stress ossidativo nel meccanismo di morte indotto dal trattamento con PN nelle cellule MG63.



**Fig. 7: Analisi morfologica degli effetti del PN in cellule di osteosarcoma umano MG63.** In alto sono illustrate le acquisizioni effettuate su cellule MG63 non trattate, mentre in basso vi sono le acquisizioni condotte in cellule trattate con partenolide 25  $\mu$ M. Tutte le acquisizioni sono state effettuate con un ingrandimento 40X dopo 2 h di trattamento. A: Morfologia cellulare osservata mediante microscopia in campo chiaro. B: Condensazione della cromatina, messa in evidenza mediante fluorescenza in seguito colorazione con Hoechst 33342. C: Sovrapposizione delle immagini riportate nei pannelli A e B. D: Colorazione delle cellule con Ioduro Propidio evidenziata con microscopia a fluorescenza.

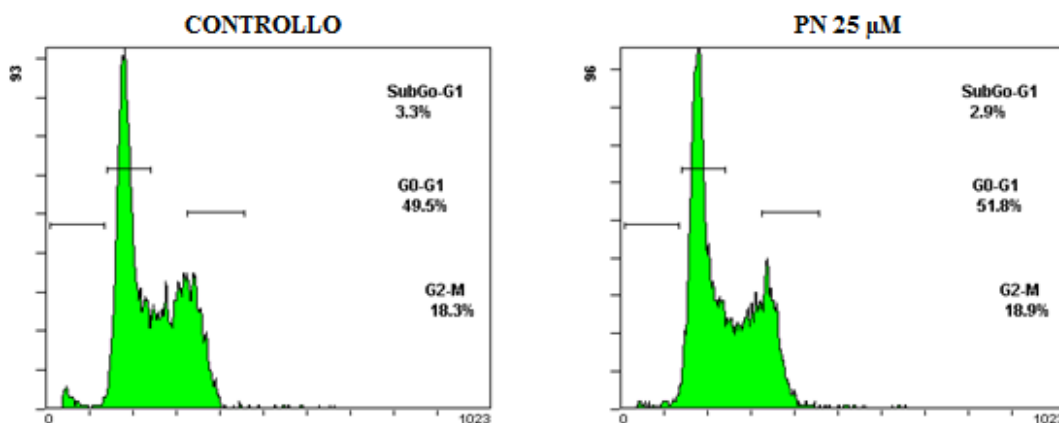


**Fig. 8: Analisi morfologica degli effetti del PN in congiunzione a z-VAD e NAC in cellule di osteosarcoma umano MG63.** In alto sono illustrate le acquisizioni effettuate su cellule MG63 trattate con PN 25  $\mu$ M in presenza di z-VAD 100  $\mu$ M, mentre in basso vi sono le acquisizioni effettuate su cellule della stessa linea trattate con PN 25  $\mu$ M e NAC 10  $\mu$ M. Tutte le acquisizioni sono state condotte con un ingrandimento 40X dopo 2 h di trattamento. A: Morfologia cellulare osservata mediante microscopia in campo chiaro. B: Condensazione della cromatina, messa in evidenza mediante fluorescenza in seguito colorazione



con Hoechst 33342. C: Sovrapposizione delle immagini riportate nei pannelli A e B. D: Colorazione con Ioduro Propidio, evidenziata con microscopia a fluorescenza.

A complemento degli studi effettuati mediante microscopia, è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica su cellule lisate e colorate mediante Ioduro di Propidio. Dall'analisi comparata dei profili citofluorimetrici ottenuti in cellule trattate con PN per 2 h e cellule controllo non trattate e si è potuto osservare come il trattamento con PN non sia in grado di modificare il picco subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, indice di frammentazione nucleare (Fig. 9).



**Fig. 9: Analisi citofluorimetrica delle cellule MG63 trattate con PN.** A sinistra è mostrato il profilo citofluorimetrico di cellule MG63 non trattate, mentre a destra è illustrato il profilo di cellule trattate per 2 h con PN 25 µM. L'analisi di citometria di flusso è stata effettuata come descritto nei metodi. Sull'asse delle ordinate è riportato il numero degli eventi, sull'asse delle ascisse è riportata l'intensità di fluorescenza. La distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo è stata calcolata mediante l'impiego del software Expo32.

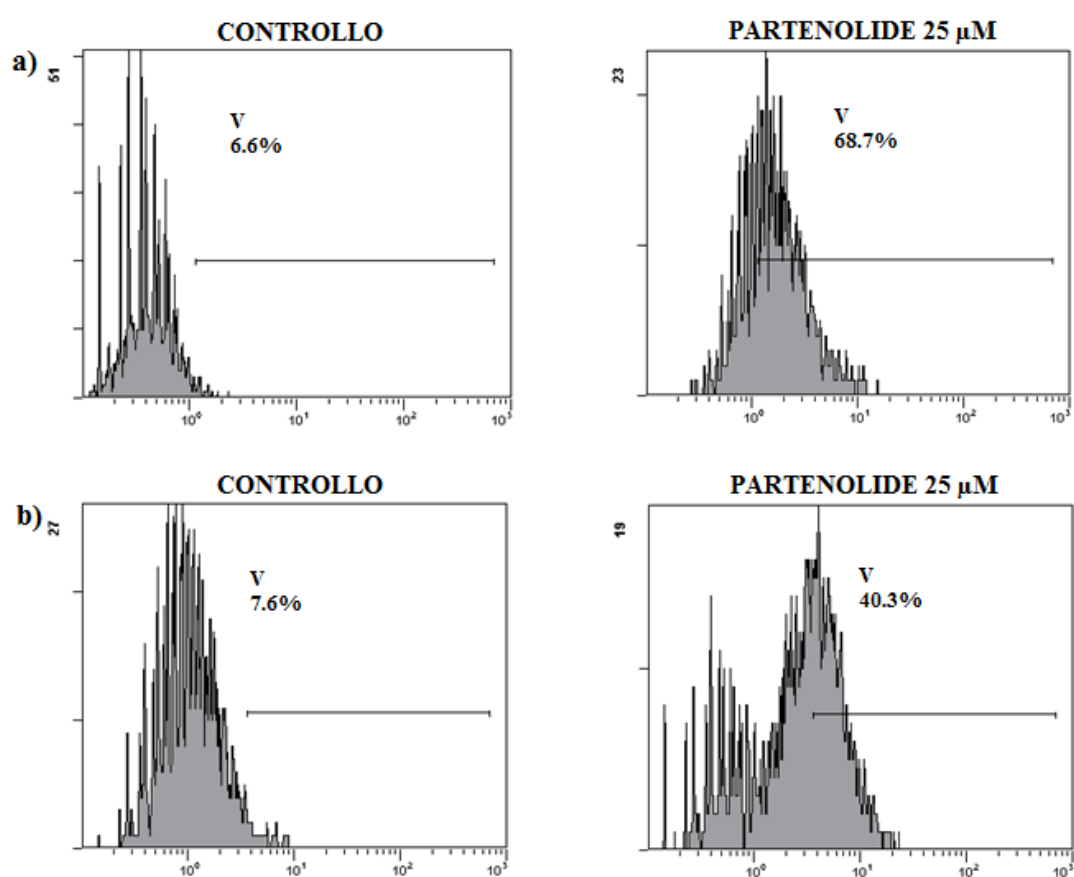
## **IL PARTENOLIDE PROVOCA UN RAPIDO INCREMENTO DEI ROS INTRACELLULARI**

In letteratura è riportato come il partenolide possa indurre morte cellulare mediante meccanismi che prevedono il coinvolgimento del mitocondrio e la produzione di specie reattive dell'ossigeno. In considerazione dell'effetto di protezione esercitato dal NAC nei confronti degli effetti citotossici del PN, abbiamo deciso d'investigare con particolare attenzione il fenomeno dello stress ossidativo in seguito a trattamento con PN, ritenendolo un possibile evento responsabile del meccanismo d'induzione di morte cellulare nel sistema sperimentale da noi studiato. A tale scopo abbiamo innanzitutto effettuato un'analisi della presenza di ROS in cellule MG63 trattate per brevi tempi (75 min e 2 ore) con PN 25  $\mu$ M, mediante citofluorimetria dopo incubazione delle cellule con 2',7'-diclorodihidrofluoresceinadiacetato ( $H_2DCFDA$ ), un composto che nelle cellule che presentano specie radicali che viene metabolizzato in una molecola fluorescente dalle esterasi cellulari. Come si osserva dalla Fig. 10, il trattamento con PN 25  $\mu$ M determina, già dopo 75 min, un marcato spostamento del picco verso destra, rispetto alle cellule non trattate, suggerendo così un notevole incremento dei ROS, evento che

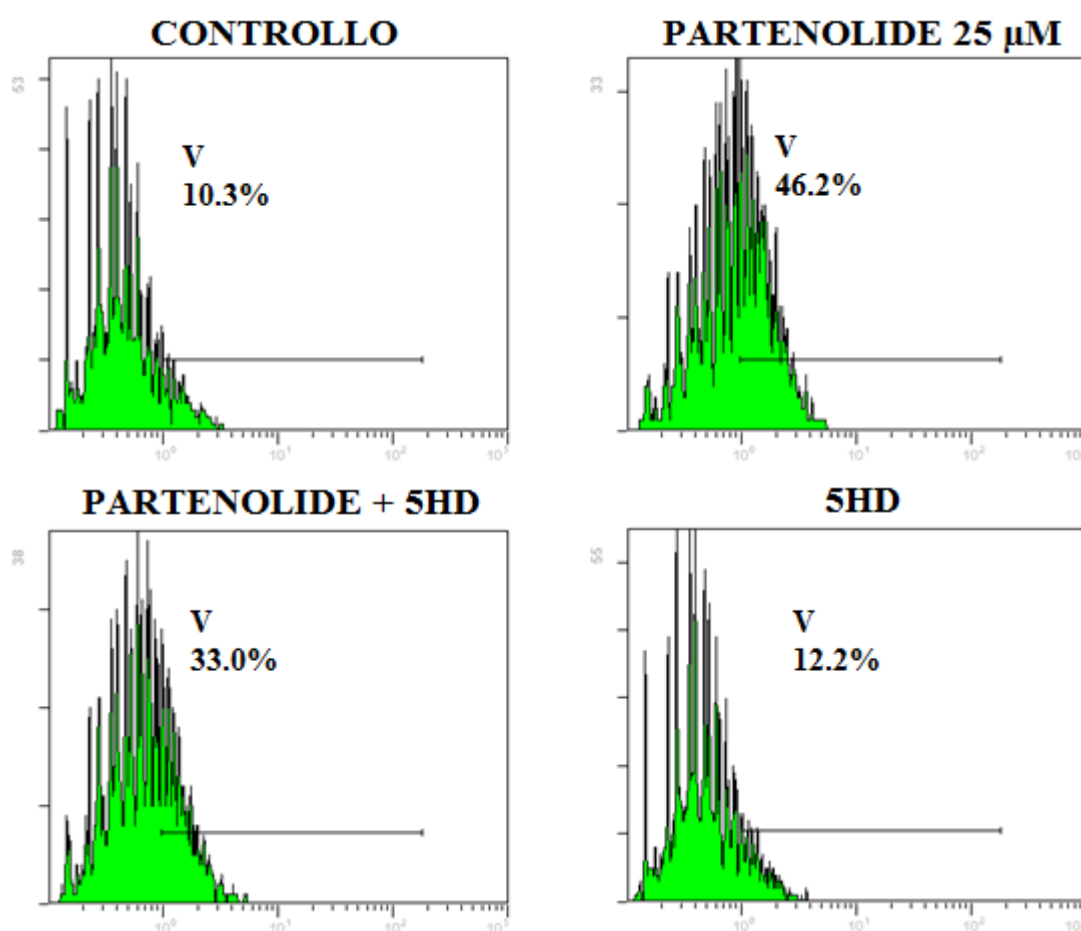
si palesa precocemente e tende a diminuire se si effettua l'analisi su cellule sottoposte ad un trattamento più prolungato (Fig. 10).

Nel tentativo di determinare l'origine delle specie reattive generate, abbiamo ipotizzato il coinvolgimento del mitocondrio e la modalità attraverso cui può concorrere alla produzione e al rilascio di ROS. Il mitocondrio, come è noto, è presente in numerosi meccanismi di morte cellulare e alcuni dati in letteratura lo indicano come possibile bersaglio del PN. Alcuni dati presenti in letteratura indicano anche che il rilascio di ROS prodotti dal mitocondrio è mediato da MitoK<sub>ATP</sub>, un canale per il potassio ATP sensibile. In rapporto a tali osservazioni, abbiamo ipotizzato che questo canale potesse rappresentare un possibile bersaglio del partenolide nella nostra linea cellulare di osteosarcoma. Per verificare quest'ipotesi abbiamo incubato le cellule MG63 per 75 minuti, in presenza di 5-idrossidecanoato (5HD), un inibitore di MitoK<sub>ATP</sub>. Come si può osservare nella Fig. 11, il trattamento con PN 25µM induce dopo 75 min un incremento di ROS pari al 46.2%, rispetto al controllo (10.3%). L'aggiunta di 5HD è in grado di contrastare parzialmente la produzione di ROS indotta dal PN (33.0%), confermando un ruolo da parte del mitocondrio, e di MitoK<sub>ATP</sub> in particolare, nello stress ossidativo indotto dal PN. L'aggiunta di 5HD alle cellule MG63 non

trattate non induce da solo alcun effetto rispetto alle cellule controllo non trattate.



**Fig. 10: Produzione di ROS ottenuti dopo trattamento con Partenolide.** Profili citofluorimetrici in seguito a colorazione con carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA per cellule MG63 non trattate e trattate con Partenolide 25  $\mu$ M per 75 min (a) e per 120 min (b).

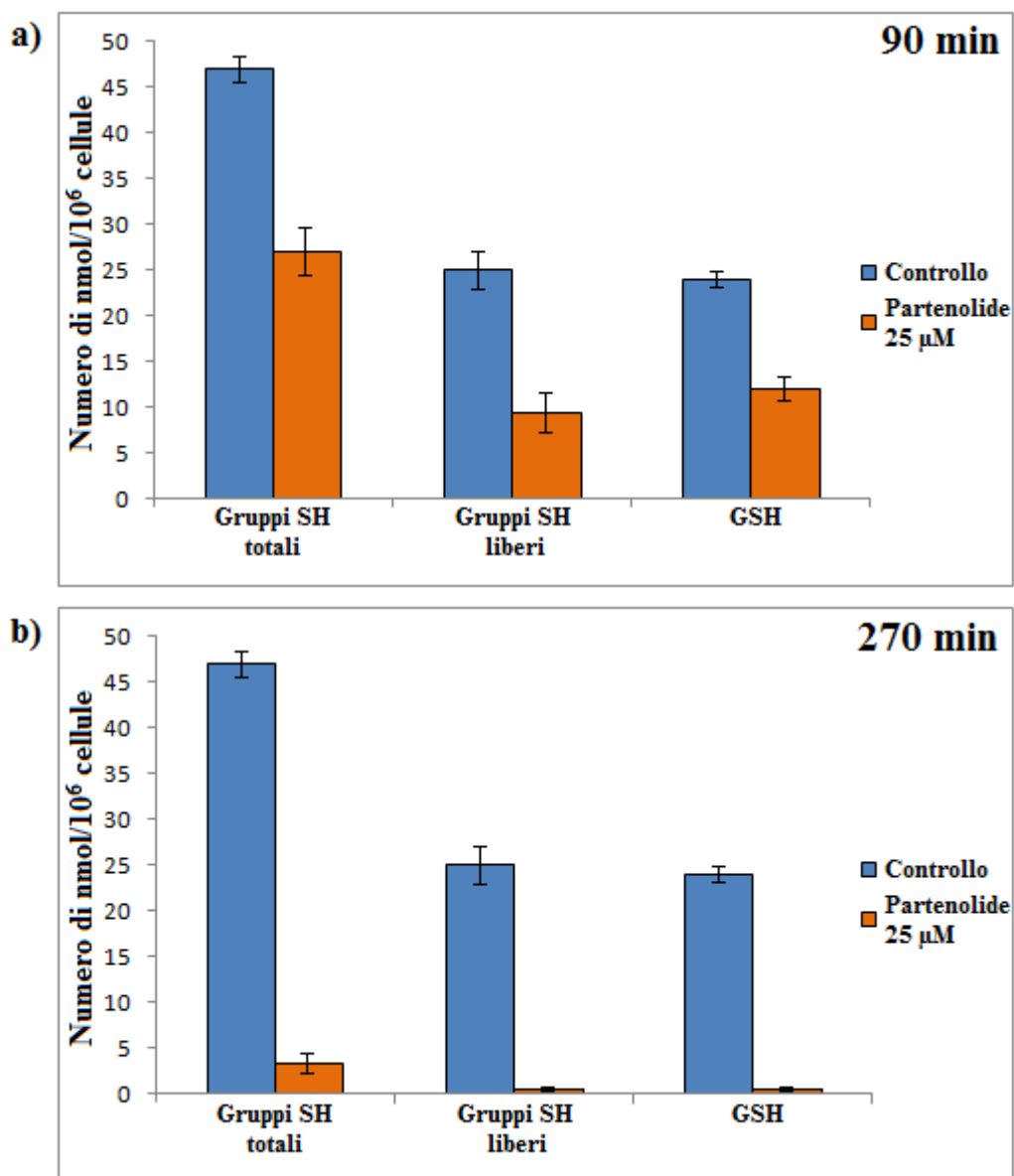


**Fig. 11: Il 5HD contrasta la produzione di ROS indotta dal PN.** Profili citofluorimetrici in seguito a colorazione con carbossi- $H_2DCFDA$  per cellule MG63 non trattate e trattate per 75 min con Partenolide 25  $\mu$ M e/o con 5HD 400  $\mu$ M.

## **IL PARTENOLIDE CAUSA UNA DIMINUZIONE DEI GRUPPI SULFIDRILICI CELLULARI**

Le analisi sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno precedentemente illustrate hanno messo in luce un'elevata produzione di ROS in cellule trattate con partenolide dopo tempi molto brevi, nonché un coinvolgimento del mitocondrio negli eventi di stress ossidativo. Poiché tali eventi spesso inducono l'ossidazione sia dei gruppi sulfidrilici ridotti intracellulari che del glutathione (GSH), abbiamo ritenuto interessante investigare un'eventuale effetto del partenolide sui gruppi tiolici intracellulari nel nostro sistema sperimentale. A tale scopo, così come riportato nei metodi, abbiamo applicato tre differenti protocolli d'analisi spettrofotometrica mediante Reagente di Ellman per l'analisi di GSH, gruppi sulfidrilici liberi e gruppi sulfidrilici totali su lisati cellulari di MG63 raccolte in seguito a trattamento con PN per circa 2 ore. In parallelo sono state condotte le analisi in cellule controllo non sottoposte al trattamento. Il confronto tra i dati ottenuti nelle cellule trattate e nei controlli è mostrato nella Fig. 12. Come si può vedere, il trattamento con PN provoca una drastica riduzione tanto del GSH (caduta del ~50%), quanto del contenuto intracellulare di gruppi sulfidrilici liberi (caduta

del ~62%) e totali (caduta del ~43%), già dopo 90 minuti di trattamento (Fig 12a). Tale fenomeno, come mostrato in Fig. 12b, aumenta notevolmente dopo 4.5 h di trattamento, a differenza di quanto accade con l'aumento dei ROS, che tende a decadere rapidamente dopo il le prime fasi di trattamento. In particolare, si osserva un decremento pressoché completo di gruppi sulfidrilici liberi e GSH, superiore al 98% per entrambi, mentre per i gruppi sulfidrilici totali il decremento è leggermente inferiore al 93%.



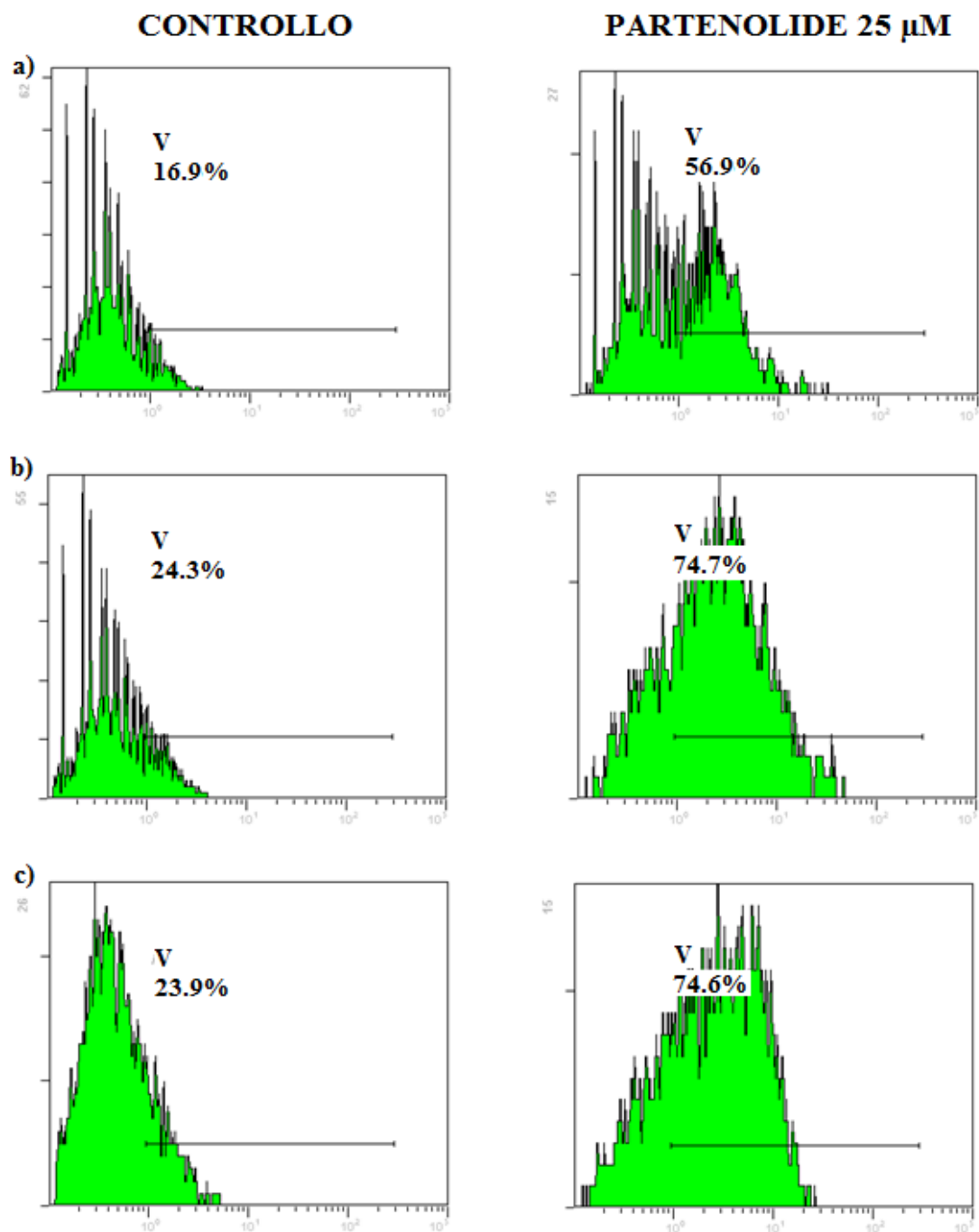
**Fig. 12: Caduta dei gruppi sulfidrilici ridotti intracellulari in seguito a trattamento con PN.** Gli istogrammi mostrano la media del numero di moli di gruppi sulfidrilici per milione di cellule, estrapolati dalle assorbanze lette in tre esperimenti e confrontate con curve standard di NAC (per gruppi SH liberi e totali) o di GSH (per il GSH). (a): Analisi del contenuto di GSH e gruppi sulfidrilici totali e liberi dopo 90 min di trattamento con PN. (b): Analisi del contenuto di GSH e gruppi sulfidrilici totali e liberi dopo 4 h e 30 min di trattamento con PN.



## **IL TRATTAMENTO CON PARTENOLIDE PROVOCA UN RAPIDO INCREMENTO DEL CALCIO INTRACELLULARE**

Sebbene gli esperimenti di trattamento combinato delle cellule MG63 con PN e 5HD abbiano suggerito un coinvolgimento del mitocondrio all'origine della produzione dei ROS generati in seguito al trattamento con partenolide, essi hanno anche messo in evidenza come  $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$  non possa essere considerato l'unica fonte da cui si generano i ROS. L'incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare è già stato associato in diversi sistemi alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e abbiamo pertanto deciso di verificare se nel nostro sistema sperimentale fosse possibile un coinvolgimento dello ione. A tale scopo abbiamo effettuato un'analisi citofluorimetrica in seguito a colorazione con l'estere tetrakis(acetossimetil) acido 4-(6-Acetossimetossi-2,7-dicloro-3-ossido-9-xantenil)-4'-metil-2,2'-(etilene-diossi)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetico, anche noto come Fluo 3-AM.

L'analisi è stata svolta su cellule trattate per tempi variabili da 30 min a 6 ore. Come mostrato in Fig. 13, già dopo mezz'ora di trattamento, il partenolide determina un incremento del Calcio intracellulare pari al 56.9% rispetto al controllo (16.9%). Tale efflusso rimane costante anche dopo 6 h di trattamento.

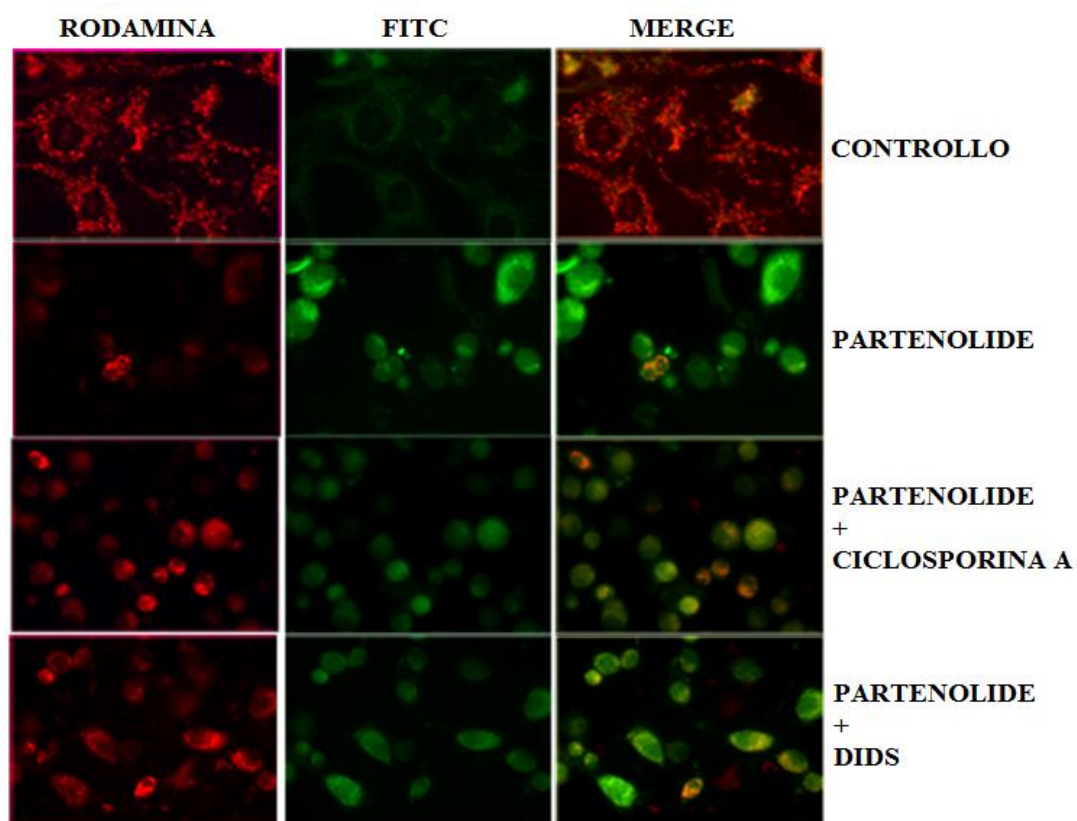


**Fig. 13: Incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare in seguito a trattamento con PN.** Profili citofluorimetrici in seguito a colorazione con Fluo3-AM per cellule MG63 non trattate e trattate con Partenolide 25  $\mu$ M per 30 min (a), 120 min (b) e 6 h (c).

## **IL TRATTAMENTO CON PARTENOLIDE PROVOCA DISSIPAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE ( $\Delta\psi_m$ )**

Alla luce di quanto osservato in relazione della produzione di ROS e al decremento dei gruppi sulfidrilici in sede mitocondriale, abbiamo ritenuto necessaria l'analisi di un altro importante indice di stress a carica dell'organello: la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ). A tale scopo abbiamo adoperato una tecnica di microscopia a fluorescenza su cellule trattate con partenolide per 90 min e successivamente colorate con 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina ioduro (o JC-1). Tale composto, nelle cellule con membrana mitocondriale integra penetra all'interno e si dirige nella matrice mitocondriale. In presenza un  $\Delta\psi_m$  fisiologico forma degli aggregati-J che danno fluorescenza nel rosso. Se il  $\Delta\psi_m$  è dissipato, il composto s'accumula nel citosol nella sua forma monomeric, fluorescente verde. Nella parte in alto della Fig. 14, sono mostrate delle immagini rappresentative dei risultati ottenuti. La fluorescenza nel rosso è prevalente nelle cellule di controllo, indice di un corretto funzionamento della membrana mitocondriale, mentre nelle cellule trattate con PN per 90 min è osservabile un forte incremento della fluorescenza nel verde, conseguenza di un fenomeno consistente di dissipazione del  $\Delta\psi_m$ . La dissipazione del potenziale

può essere spesso messa in relazione a uno scorretto funzionamento del complesso del poro della membrana mitocondriale e abbiamo pertanto voluto verificare se proprio le proteine del poro potessero essere bersagli dell'azione del partenolide e responsabili della dissipazione del potenziale. A tale scopo, abbiamo ripetuto l'esperimento, trattando le cellule unitamente con PN e con due inibitori dell'apertura delle componenti interna (ANT) ed esterna (VDAC) del poro, rispettivamente la Ciclosporina A e l'acido 4,4'-Diisothiociano-2,2'-stilbenedisulfonico (o DIDS). Nella parte inferiore della Fig. 14, è possibile vedere come entrambi i composti abbiano sortito un effetto di protezione parziale dalla dissipazione del  $\Delta\psi_m$ , messo in evidenza dalla sovrapposizione delle acquisizioni nei campi rosso e verde, che mostra una colorazione più tendente al giallo, rispetto a quella mostrata dalle cellule trattate col solo partenolide. È stato pertanto confermato il coinvolgimento del poro di membrana nel meccanismo di dissipazione del potenziale mitocondriale.

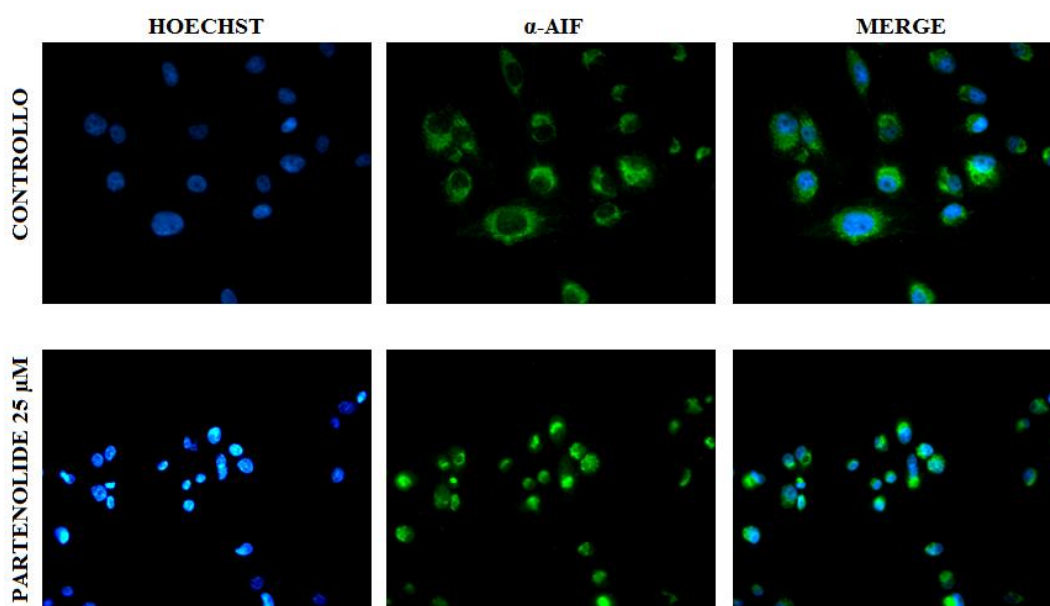


**Fig. 14: Induzione di dissipazione del potenziale di membrana ( $\Delta\psi_m$ ) da parte dal partenolide ed effetto di protezione da Ciclosporina A e DIDS.** In tutti i riquadri sono mostrate delle immagini rappresentative della fluorescenza emessa dalle cellule colorate mediante JC-1. La colonna a sinistra mostra l'acquisizione di fluorescenza nel rosso, quella al centro l'acquisizione nel verde e quella a destra la sovrapposizione delle due immagini e la colorazione risultante.

## **IL PARTENOLIDE INDUCE LA TRASLOCAZIONE DEL FATTORE DI MORTE AIF DALLA SEDE MITOCONDRIALE AL NUCLEO**

Com'è noto, la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale provoca il rilascio da parte del mitocondrio di diversi fattori di morte cellulare, come il citocromo *c* e AIF. Il fattore AIF successivamente è noto traslocare al nucleo dove svolge la propria azione, provocando condensazione della cromatina e induzione di morte cellulare. Poiché negli esperimenti prima descritti sono stati confermati in seguito a trattamento con partenolide fenomeni di dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e di condensazione della cromatina, abbiamo deciso di verificare se nei meccanismi di morte innescati dal composto nel nostro sistema fossero coinvolte la fuoriuscita di AIF dal mitocondrio e la sua traslocazione in sede nucleare. A tale scopo abbiamo adoperato un protocollo di immunofluorescenza su cellule MG63 trattate con PN per 2 ore, i cui nuclei sono stati messi in evidenza mediante colorazione con Hoechst 33342. Come mostrato nella Fig. 15, l'anticorpo specifico per AIF ha dato luogo a una colorazione perinucleare nelle cellule MG63 non trattate, mentre nelle cellule trattate con PN si osserva una sovrapposizione delle colorazioni effettuate con l'anticorpo fluorescente e con l'Hoechst. Tali dati,

rivelano pertanto che AIF trasloca dalla propria sede naturale mitocondriale a quella nucleare come conseguenza del trattamento col PN.



**Fig. 15: Il PN Induce il rilascio da parte del mitocondrio del fattore AIF e la sua traslocazione al nucleo.** In figura sono mostrati delle immagini rappresentative del risultato dell'immunofluorescenza effettuata su cellule MG63 i cui nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342 (a sinistra) e incubate per 1 ora con un anticorpo primario specifico per AIF e successivamente con un secondario coniugato a fluoresceina (al centro). A destra è mostrata la sovrapposizione delle colorazioni ottenute mediante Hoechst 33342 e immunofluorescenza nel verde. In alto sono mostrate le cellule di controllo, mentre in basso sono mostrate le cellule trattate con PN 25 μM.

## **DISCUSSIONE**

In questo studio sperimentale per la prima volta è stato valutato l'effetto in vitro del partenolide sulla vitalità di una linea cellulare di osteosarcoma umano (MG63). L'unico dato presente in letteratura in merito al rapporto tra partenolide ed osteosarcoma, infatti, consiste in una valutazione dell'effetto d'inibizione ad opera del partenolide sulla produzione di metastasi in sede polmonare da parte della linea di osteosarcoma murina LM8 [80].

L'analisi morfologica delle cellule MG63 in seguito a trattamento con PN ha messo in evidenza i chiari effetti citotossici del composto, che si manifestano dopo appena 2 h di trattamento con perdita della morfologia originaria e successivo distacco delle cellule dal supporto di crescita. Inoltre, è stato possibile osservare un consistente fenomeno di condensazione della cromatina, che non prelude a frammentazione della stessa, come messo in evidenza da un'analisi comparata del profilo citofluorimetrico di cellule trattate con PN e non trattate in seguito a colorazione con ioduro di propidio. Inoltre, il trattamento delle cellule con l'inibitore generale delle caspasi z-VAD



non è stato in grado di contrastare in alcun modo gli effetti citotossici del PN. Tale dato suggerisce che il meccanismo di morte indotto dal PN in questo sistema sperimentale è caspasi-indipendente.

Poiché in letteratura è riportato che il PN induce la produzione di ROS [32-37], abbiamo deciso di verificare se il fenomeno di morte cellulare osservato nel nostro sistema sperimentale prevedesse il coinvolgimento dello stress ossidativo. A tal fine abbiamo trattato le cellule con PN in presenza di un noto agente antiossidante, l'N-acetilcisteina (NAC). Tale composto è stato in grado d'annullare completamente tanto gli effetti citotossici esercitati dal PN, quanto la condensazione della cromatina da esso indotta, suggerendo un ruolo predominante dello stress ossidativo nei meccanismi di morte cellulare indotti dal PN nelle cellule di osteosarcoma MG63.

Alla luce dei dati morfologici ottenuti, abbiamo quindi deciso di analizzare con maggiore dettaglio il meccanismo col quale s'instaura lo stress. A tale scopo abbiamo valutato i livelli dei gruppi tiolici totali e liberi intracellulari e del GSH ridotti mediante tecniche spettrofotometriche facenti uso del reagente di Ellman. È stata effettivamente evidenziata una caduta protratta nel tempo dei gruppi sulfidrilici e del GSH in seguito a trattamento con PN, che può essere messa in relazione all'induzione dello stress ossidativo. È a conferma di tale fenomeno che è stata quindi effettuata una valutazione

mediante tecnica citofluorimetrica della presenza di ROS in seguito a trattamento con PN. Tale analisi ha dimostrato come il PN provochi un rapido ma transiente aumento dei ROS dopo appena 75 di trattamento. Abbiamo inoltre osservato come l'incremento dei ROS nella prima fase del trattamento con PN s'accompagni a un rapido incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, evento che come è noto può contribuire all'instaurarsi dello stress ossidativo [81].

In considerazione del ruolo centrale svolto dal mitocondrio in molteplici meccanismi di morte cellulare [44-62], abbiamo ritenuto importante valutare un importante parametro dello stress a carico dell'organello, associato all'incremento dei ROS: la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ). L'analisi effettuata mediante microscopia a fluorescenza col metodo del JC1 ha messo in evidenza un forte fenomeno di dissipazione del  $\Delta\psi_m$  in seguito al trattamento con PN, che suggerisce il mitocondrio come una possibile sede all'origine dei ROS prodotti. In particolare è possibile che ROS prodotti nella matrice mitocondriale possano fuoriuscirne attraverso il complesso del poro, provocando stress ossidativo a livello cellulare. L'apertura del poro di membrana mitocondriale, costituito da una componente esterna di cui VDAC è il principale componente e una interna che comprende ANT, potrebbe essere anche responsabile della depolarizzazione della membrana. L'analisi mediante JC1 di cellule

trattate con PN in presenza di DIDS (inibitore di VDAC), o di Ciclosporina A (inibitore di ANT), hanno chiaramente mostrato come l'apertura del poro di membrana mitocondriale sia necessaria perché avvenga il fenomeno di depolarizzazione della membrana mitocondriale indotto dal PN. Per valorizzare l'ipotesi di un'origine mitocondriale dei ROS, abbiamo effettuato delle ricerche in letteratura. Il canale mitocondriale per il potassio ATP-sensibile (MitoK<sub>ATP</sub>) sembra avere un ruolo emergente nella produzione dei ROS a carico del mitocondrio, come già dimostrato in molteplici studi effettuati su cardiomiociti [82]. In questo studio per la prima volta viene valutato l'effetto del partenolide sulla produzione di ROS da parte delle cellule MG63 in seguito all'aggiunta dell'inibitore di MitoK<sub>ATP</sub> maggiormente adoperato in letteratura, il 5-idrossidecanoato (5HD) [83]. Il composto si è rivelato in grado di contrastare la produzione dei ROS indotta dal trattamento con PN, mettendo così alla luce una relazione tra i meccanismi di morte ROS-dipendenti indotti dal PN e MitoK<sub>ATP</sub>, relazione mai osservata in studi precedenti. Tale esperimento ha inoltre confermato nelle cellule di osteosarcoma MG63 il coinvolgimento del mitocondrio nei meccanismi di morte innescati dal trattamento con partenolide.

Alla luce di dati presenti in letteratura in merito al rilascio da parte del mitocondrio di diversi fattori di morte in seguito a dissipazione del

potenziale della membrana mitocondriale [56-62], abbiamo deciso di verificare mediante immunofluorescenza se anche nel nostro sistema fosse possibile tracciare una relazione tra fattori d'origine mitocondriale e i fenomeni morfologici a carico della cromatina. In letteratura è ampiamente documentato l'effetto di condensazione della cromatina ad opera del Fattore che Induce l'Apoptosi (AIF) [60], proteina di origine mitocondriale e abbiamo pertanto verificato se il partenolide fosse in grado di indurre la sua traslocazione al nucleo mediante immunofluorescenza. I nostri esperimenti hanno confermato in cellule MG63 trattate con PN, la fuoriuscita di AIF dal mitocondrio e la sua traslocazione al nucleo.

In conclusione i dati raccolti dimostrano per la prima volta gli effetti citotossici del partenolide, composto naturale e dalla bassissima tossicità per cellule normali, su cellule di osteosarcoma umano. È stato messo in evidenza un meccanismo di morte caspasi-indipendente basato sull'induzione di stress ossidativo nel quale un ruolo centrale è svolto dal mitocondrio. Viene inoltre indicato per la prima volta nei pathway di morte indotti dal PN il coinvolgimento di MitoK<sub>ATP</sub>, come responsabile, insieme probabilmente all'incremento del Ca<sup>2+</sup> e alla caduta dei gruppi sulfidrilici intracellulari, dell'induzione di stress ossidativo nel sistema sperimentale studiato. Il ruolo del mitocondrio nel meccanismo studiato non si limita tuttavia a quello di origine dei

ROS, infatti la depolarizzazione della membrana mitocondriale concomitante all'apertura del poro ha come effetto la traslocazione al nucleo di AIF con conseguente condensazione della cromatina.

I dati prodotti in questo studio sugli effetti del PN in una linea cellulare di osteosarcoma umano, costituiscono un'incoraggiante evidenza del possibile impiego del farmaco nel prossimo futuro nella terapia di questa forma tumorale, tuttora caratterizzata da un'elevata mortalità e frequente insorgenza di resistenza alle terapie attualmente in uso.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. **What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?** *Drug Discov Today* (2010) 15(15-16), 668-678.
- 2 - Balunas MJ, Kingborn AD. **Drug discovery from medicinal plants.** *Life Sci* (2005) 78, 431–441.
- 3 - Onozato T, Nakamura CV, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T. ***Tanacetum vulgare*: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide.** *Phytoterapy Research* (2009) 23 (6), 791 – 796.
- 4 – Zhang S, Ong CN, Shen HM. **Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in partenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis.** *Cancer Lett* (2004) 211 (2), 175-188.
- 5 – Kupchan SM, Eakin MA, Thomas AM. **Tumor Inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones.** *J Med Chem* (1971) 14 (12), 1147-1152.
- 6 – Lee KH, Huang ES, Piantadosi C, Pagano JS, Geissman TA. **Cytotoxicity of sesquiterpene lactones.** *Cancer Res* (1971) 31 (11), 1649-1654.
- 7 – Lee KH, Meck R, Piantadosi C, Huang ES. **Antitumor agents. 4. Cytotoxicity and in vitro activity of helenalin esters and related derivatives.** *J Med Chem* (1973) 16 (3), 299-301.
- 8 - Hall IH, Lee KH, Starnes CO, Egebalay SA, Ibuka T, Wu YS, Kimura T, Haruna M. **Antitumor agents XXX: Evaluation of alpha-methylene-gamma-lactone-containing agents for inhibition of tumor growth, respiration, and nucleic acid synthesis.** *J Pharm Sci* (1978) 67 (9), 1235-1239.
- 9 – Beekman AC, Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N, Konings AW, Wikstrom HV, Schmidt TJ. **Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpeni lactones.** *J Nat Prod* (1997) 60 (3), 252-257.
- 10 - Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. **Nuclear factor- B, cancer and apoptosis.** *Biochem Pharmacol* (2000) 60, 1085-1090.
- 11 - Trubiani O, Salvolini E, Vignini A, D'Arcangelo C, Di Primo R, Mazzanti L. **NF-kappaB and NOS may play a role in human RPMI-8402 cell apoptosis.** *Cell Biol Int* (2005) 29, 529-536.
- 12 - Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. **Nuclear factor-kappa B and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells.** *Cancer Res* (2007) 67, 3220-3228.
- 13 - Wang T, Zhang X, Li JJ. **The role of NF-κB in the regulation of cell stress responses.** *Int Immunopharmacol* (2002) 2, 1509-1520.
- 14 - Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, Bergman L, Schmid RM, Dohner H, Heimpel H. **Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic**

**leukemia: analysis of NF-kappaB/Rel-regulated inhibitors of apoptosis.** *Blood* (2002) 100, 3749-3756.

15 - Staudt LM. **Oncogenic activation of NF-kB.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010) 2, 1-30.

16 - Storz P, Doppler H, Ferran C, Grey ST, Toker A. **Functional dichotomy of A20 in apoptotic and necrotic cell death.** *Biochem J* (2005) 387, 47-55.

17 - Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. **Expression of the NF-kappaB target gene X-ray-inducible immediate early response factor 1 short enhances TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation.** *J Immunol* (2003) 170, 4053-4060.

18 - Wieckowski E, Atarashi Y, Stanson J, Sato TA, Whiteside TL. **FAP-1 mediated activation of NF-kappaB induces resistance of head and neck cancer to Fas-induced apoptosis.** *J Cell Biochem* (2007) 100, 16-28.

19 - Montagut C, Tusquest I, Ferrer B, Corominas JM, Bllosillo B, Campas C, Suarez M, Fabregat X, Campo E, Gascon P, Serrano S, Fernandez PL, Rovira A, Albanell J. **Activation of nuclear factor kappaB is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients.** *Endocr Relat Cancer* (2006) 13, 607-616.

20 - Ghosh S, May MJ, Kopp EB. **NF-kB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses.** *Annu Rev Immunol* (1998) 16, 225.

21 - Hehner SP, Hofmann TG, Droge W, Schmitz ML. **The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kB by targeting the IkB kinase complex.** *J Immunol* (1999) 163, 5617-5623.

22 - Saadane A, Masters S, DiDonato J, Li J, Berger M. **Parthenolide inhibits IkappaB kinase, NF-kB activation and inflammatory response in cystic fibrosis cells in mice.** *Am J Respir Cell Mol Biol* (2007) 36, 728-36.

23 - Oka D, Nishimura K, Shiba M, Nakai Y, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Inoue H, Okuyama A, Nonomura N. **Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB.** *Int J Cancer* (2007) 120, 2576-2581.

24 - Meyer T, Vinkemeier U. **STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention.** *Expert Opin Ther Targets* (2007) 11, 1355-1365.

25 - Bromberg J. **Stat proteins and oncogenesis.** *J Clin Invest* (2002) 109, 1139-1142.

26 - Sheen-Chen SM, Huang CC, Tang RP, Yang CH, Chou FF, Eng HL. **Signal transducer and activator of transcription 1 in breast cancer: analysis with tissue microarray.** *Anticancer Res* (2007) 27, 2481-2486.

27 - Knowles BB, Howe CC, Aden DP. **Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.** *Science* (1980) 209:497-499.

- 28 - Sobota R, Szwed M, Kasza A, Bugno M, Kordula T. **Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family.** *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 267, 329-333.
- 29 - Legendre F, Dudhia J Pujol JP, Bogdanowicz P. **JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression.** *J Biol Chem* (2003) 278, 2903-2912.
- 30 - Hampton MB, Orrenius S. **Redox regulation of apoptotic cell death.** *Biofactors* (1998) 8, 1-5.
- 31 - Ghibelli I, Coppola S, Rotilio G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR. **Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion.** *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 216, 313-320.
- 32 - Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG. **Oxidative stress mediated apoptosis.** *J Biol Chem* (2002) 277, 38954-38964.
- 33 - Sun Y, St Clair DK, Xu Y, Crooks PA, St Clair WH. **A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells.** *Cancer Res* (2010) 70 (7), 2880-2890.
- 34 - Zhang S, Ong CN, Shen HM. **Involvement of proapoptotic bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis.** *Cancer Lett* (2004) 211, 175-188.
- 35 - Degenhardt K, Sundararajan R, Lindsten T, Thompson C, White E. **Bax and Bak independently promote cytochrome c release from mitochondria.** *J Biol Chem* (2002) 277, 14127-14134.
- 36 - Wang W, Adachi M, Kawamura R, Sakamoto H, Hayashi T, Ishida T, Imai K, Shinomura Y. **Parthenolide-induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity.** *Apoptosis* (2006) 11, 2225-2235.
- 37 - Zunino SJ, Ducore JM, Stroms DH. **Parthenolide induces significant apoptosis and production of reactive oxygen species in high-risk pre-B leukemia cells.** *Cancer Lett* (2007) 254, 119-127.
- 38 - Chang J, Karin M. **Mammalian MAP kinase signaling cascades.** *Nature* (2001) 410, 37-40.
- 39 - Won YK, Ong CN, Shi X, Shen HM. **Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms.** *Carcinogenesis* (2004) 25, 1449-1458.
- 40 - Shanmugam R, Jayaprakasan V, Gokmen-Polar Y, Kelich S, Miller KD, Yip-Schneider M, Cheng L, Bhat-Nakshatri P, Siedge GW, Nakshatri H, Zheng QH, Miller MA, DeGrado T, Hutchins GD, Sweeney CJ. **Restoring chemotherapy and hormone therapy sensitivity by parthenolide in a xenograft hormone refractory prostate cancer model.** *Prostate* (2006) 66, 1498-1511.
- 41 - Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. **Cycloheximidemediated sensitization to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human colorectal cancer cell line COLO 205; role of FLIP and metabolic inhibitors.** *J Physiol Pharmacol* (2005) 56, 101-118.



- 42 - Yao H, Tang X, Shao X, Feng L, Wu N, Yao K. **Parthenolide protects human lens epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis via inhibition of activation of caspase-3 and caspase-9.** *Cell Res* (2007) 17 (F), 565-571.
- 43 - Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, Jordan CT. **The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.** *Blood* (2005) 105, 4163-4169.
- 44 - Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, Michaud M, Zischka H, Castedo H, Kroemer G. **Mitochondrial gateways to cancer.** *Mol Aspects Med* (2010) 31, 1-20.
- 45 - Kushnareva Y, Newmeyer DD. **Bioenergetics and cell death.** *Ann NY Acad Sci* (2010) 1201, 50-57.
- 46 - Ricci JE, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Baliley-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR. **Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain.** *Cell* (2004) 117, 773-786.
- 47 - Skulachev VP. **Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis.** *Apoptosis* (2006) 11, 473-485.
- 48 - Chao DT, Korsmeyer SJ. **BCL-2 family: regulators of cell death.** *Annu Rev Immunol* (1998) 16, 395-419.
- 49 - Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. **Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.** *Physiol Rev* (2007) 87, 99-163.
- 50 - Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, Sollott SJ. **The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown.** *Ann NY Acad Sci* (2008) 1123, 197-212.
- 51 - Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. **Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death.** *Nat Cell Biol* (2007) 9, 550-555.
- 52 - Li T, Brustovetsky T, Antonsson B, Brustovetsky N. **Dissimilar mechanisms of cytochrome c release induced by octyl glucoside-activated BAX and by BAX activated with truncated BID.** *Biochim Biophys Acta* (2010) 1797, 52-62.
- 53 - Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. **Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death.** *Nature* (2005) 434, 652-658.
- 54 - Janssen K, Horns S, Neimann MT, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Fischer U. **Inhibition of the ER  $\text{Ca}^{2+}$  pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis.** *J Cell Sci* (2009) 122, 4481-4491.
- 55 - Shiraishi J, Tatsumi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M. **Important role of energy-dependent mitochondrial**

**pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) 281, H1637–H1647.

56 – Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. **Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited.** *Cell Mol Biol Lett* (2006) 11 (4), 506-525.

57 - Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X. **A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo.** *J Biol Chem* (2007) 282 (42), 30718-30727.

58 - Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. **HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins.** *J Biol Chem* (2002) 277, 445-454.

59 - Buttner S, Carmona-Gutierrez D, Vitale I, Castedo M, Ruli D, Eisenberg T, Kroemer G, Madeo F. **Depletion of endonuclease G selectively kills polyploid cells.** *Cell Cycle* (2007) 6, 1072–1076.

60 - Joza N, Pospisilik JA, Benit P, Rangachari M, Nakashima Y, Rustin P, Abrams JM, Kroemer G, Penninger JM. **The molecular archeology of a caspase-independent death effector: AIF in *Drosophila*.** *Cell Death Differ* (2008) 15 (6), 1009-1018.

61 - Cande C, Vahsen N, Metivier D, Tourriere H, Chebli K, Garrido C, Tazi J, Kroemer G. **Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor.** *J Cell Sci* (2004) 117, 4461–4468.

62 - Joza N, Oudit GY, Brown D, Benit P, Kassiri Z, Vahsen N, Benoit L, Patel MM, Novikovskiy K, Vassault A, Backx PH, Wada T, Kroemer G, Rustin P, Penninger JM. **Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy.** *Mol Cell Biol* (2005) 25, 10261–10272.

63 – Weinberg F, Chandel NS. **Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer.** *Cell Mol Life Sci* (2009) 66, 3663–3673.

64 – Igney FH, Krammer PH. **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** *Nat Rev Cancer* (2002) 2, 277–288.

65 – Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. **The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies.** *Biochim Biophys Acta* (2010) 1797, 1225–1230.

66 – Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. **Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II.** *Cell Death Differ* (2008) 15, 521–529.

67 – Shulga N, Wilson-Smith R, Pastorino JG. **Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria.** *J Cell Sci* (2010) 123, 894–902.

68 – Bellance N, Benard G, Furt F, Begueret H, Smolková K, Passerieux E, Delage JP, Baste JM, Moreau P, Rossignol R. **Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity.** *Int J Biochem Cell Biol* (2009) 41, 2566–2577.

- 69 – Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Bérout C, Demont J, Bouvier R, Schägger H, Godinot C. **Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma.** *Carcinogenesis* (2002) 23, 759–768.
- 70 – Hao W, Chang CP, Tsao CC, Xu J. **Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization.** *J Biol Chem* (2010) 285, 12647–12654.
- 71 – Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. **The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology.** *EMBO J* (2002) 21, 221–230.
- 72 – Siclari VA, Ling Q. **Targeting the osteosarcoma cancer stem cells.** *J Orthop Surg Res* (2010) 5, 78-87.
- 73 - Kubista B, Klinglmueller F, Bilban M, Pfeiffer M, Lass R, Giurea A, Funovics PT, Toma C, Dominkus M, Kotz R, Thalhammer T, Trieb K, Zetti T, Singer CF. **Microarray analysis identifies distinct gene expression profiles associated with histological subtype in human osteosarcoma.** *Int Orthop* (2010).
- 74 - Cleton-Jansen AM, Anninga JK, Briaire-de Bruijn IH, Romeo S, Oosting J, Egeler RM, Gelderblom H, Taminiau AH, Hogendoorn PC. **Profiling of highgrade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumourigenic pathways.** *Br J Cancer* (2009) 101, 1909-1918.
- 75 - Skubitz KM, D'Adamo DR. **Sarcoma.** *Mayo Clin Proc* (2007) 82 (11), 1409-1432.
- 76 - Sadikovic B, Thorner P, Chilton-Macneill S, Martin JW, Cervigne NK, Squire J, Zielenska M. **Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy.** *BMC Cancer* (2010) 10, 202-210.
- 77 - Ta HT, Dass CR, Choong PF, Dunstan DE. **Osteosarcoma treatment: state of the art.** *Cancer Metastasis Rev* (2009) 28, 247-263.
- 78 – Pereira BP, Zhou Y, Gupta A, Leong DT, Aung KZ, Ling L, Pho RW, Galindo M, Salto-Tellez M, Stein GS, Cool SM, van Wijnen AJ, Nathan SS. **Runx2, p53, and pRB status as diagnostic parameters for deregulation of osteoblast growth and differentiation in a new pre-chemotherapeutic osteosarcoma cell line (OS1).** *J Cell Physiol* (2009) 221 (3), 778-788.
- 79 – Krishan A. **Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining.** *J Cell Biol* (1975) 66 (1), 188-193.
- 80 - Kishida Y, Yoshikawa H, Myoui A. **Parthenolide, a natural inhibitor of Nuclear Factor-kappaB, inhibits lung colonization of murine osteosarcoma cells.** *Clin Cancer Res* (2007) 13 (1), 59-67.
- 81 – Peng TI, Jou MJ. **Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload.** *Ann N Y Acad Sci* (2010) 1201, 183-188.

82 – Wun YN, Yu H, Zhu XH, Yuan HJ, Kang Y, Jao JJ, Gao WZ, Liu YX, Lou JS. **Noninvasive delayed ischemic precondition attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by a mitochondrial K(ATP) channel-dependent mechanism.** *Physiol Res* (2010) In Press.

83 – Feng J, Zuo Z. **Isoflurane preconditioning increases endothelial cell tolerance to in-vitro stimulated ischemia.** *J Pharm Pharmacol* (2011) 63 (1), 106-110.